



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN
SANITARIA ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2017/1018

**Estudio de la Función de la Cx43 a
Nivel Exosomal en Melanoma**

Amanda Guitián Caamaño

21 de Junio de 2018

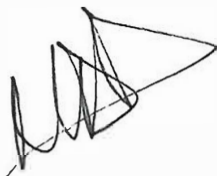
TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

La **Dra. María Mayán Santos**, Investigadora coordinadora del grupo CellCOM en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y el **Dr. Eduardo Fonseca Capdevila**, jefe del servicio de dermatología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC-XXIAC)

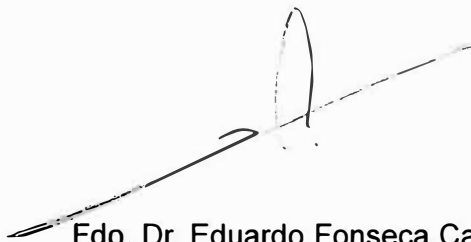
CERTIFICAN QUE:

La presente memoria de trabajo de máster titulada: **“Estudio de la Función de la Cx43 a Nivel Exosomal en Melanoma”** presentada por Doña Amanda Guitián Caamaño, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Grupo CellCOM del INIBIC dentro del programa de máster en Asistencia e Investigación Sanitaria de la UDC.

Para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña a 14 de junio de 2018.



Fdo. Dra. María D. Mayán Santos
Directora del TFM



Fdo. Dr. Eduardo Fonseca Capdevila
Director del TFM



Fdo. Amanda Guitián Caamaño

Índice

Abreviaturas	3
Resumen	7
1. Introducción.....	11
2. Objetivos	16
3. Material y Métodos	17
3.1. <i>Cultivo de líneas celulares</i>	<i>17</i>
3.2. <i>Inmunofluorescencia</i>	<i>17</i>
3.3. <i>Co-Inmunoprecipitación de proteínas (CoIP).....</i>	<i>18</i>
3.4. <i>Tinción con plata.....</i>	<i>19</i>
3.5. <i>Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot.....</i>	<i>20</i>
3.6. <i>Aislamiento de exosomas</i>	<i>22</i>
3.7. <i>Extracción de ARN.....</i>	<i>23</i>
3.8. <i>Retrotranscripción de ARN</i>	<i>23</i>
3.9. <i>Análisis de la expresión génica.....</i>	<i>24</i>
3.10. <i>Transfección mediante electroporación</i>	<i>24</i>
3.11. <i>Formación de colonias.....</i>	<i>25</i>
3.12. <i>Ensayo de herida</i>	<i>25</i>
3.13. <i>Análisis del componente proteico mediante espectrometría de masas.</i>	<i>26</i>
3.14. <i>Ontología de genes.....</i>	<i>26</i>
4. Resultados	27
4.1. <i>Sobreexpresión de la Cx43 en melanoma.....</i>	<i>27</i>
4.2. <i>Aislamiento y caracterización de exosomas aislados de líneas de melanoma con altos niveles de expresión de Cx43</i>	<i>29</i>
4.3. <i>Efecto de los exosomas positivos para Cx43 en las células de melanoma.....</i>	<i>31</i>
.....	32
4.4. <i>Caracterización del componente proteico en exosomas positivos y negativos para Cx43 aislados de células de melanoma.....</i>	<i>32</i>
5. Discusión	41
6. Conclusiones.....	44
7. Apéndices	45
7.1. <i>Índice de figuras.....</i>	<i>45</i>
7.2. <i>Índice de tablas.....</i>	<i>46</i>
8. Agradecimientos	47

9. Bibliografía.....	49
Tabla suplementaria 1. Proteínas presentes en los exosomas positivos para Cx43.	53
Tabla suplementaria 2. Proteínas presentes en los exosomas negativos para Cx43.	57
Tabla suplementaria 3. Proteínas exclusivas presentes en los exosomas positivos para Cx43.	60
Tabla suplementaria 4. Proteínas exclusivas presentes en los exosomas negativos para Cx43.	61

Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ADNasa - Actividad desoxirribonucleasa

ADNc - ADN complementario

AG - Aparato de Golgi

ARN - Ácido ribonucleico

ARNm - ARN mensajero

ATP - Adenosín trifosfato

BSA - Albúmina de suero bovino

ChIP - Inmunoprecipitación de cromatina

cm - Centímetros

CMV - Citomegalovirus

CO₂ - Dióxido de carbono

CoIP - CoInmunoprecipitación de proteínas

CTD - Dominio C terminal

Cx26 - Conexina 26

Cx43 - Conexina 43

Cxs - Conexinas

C° - Grados centígrados

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ECT - Extracto celular total

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

ERCx - Elementos de respuesta a conexinas

ERK - Kinasa regulada por señales extracelulares

FDR - Tasa de falsos positivos

h - Horas

HCl - Ácido clorhídrico

IFN-γ - Interferón gamma

IP - Inmunoprecipitación

kDa - Kilo Daltons

LY - Lucifer Yellow

M - Molar

MALDI - Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz

MAPK - Proteína kinasa activada por mitógenos

miARN - Micro ácido ribonucleico

min - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetros

mM - Milimolar

MS - Espectrometría de masas

MS/MS - Espectrometría de masas en tándem

N/S - No *serum*

nm - Nanómetro

OG - Ontología de genes

P/S - Penicilina/Streptomicina

PAGE - Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida

Panxs - Panexinas

Panx1 - Panexina 1

Panx2 - Panexina 2

Panx3 - Panexina 3

PBS - Tampón fosfato salino

PBST - Tampón fosfato salino con Tween

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSA - Persulfato amónico

PVDF - Polifluoruro de vinilideno

RER - Retículo endoplasmático rugoso

rpm - Revoluciones por minuto

RT - Tiempo real

SBF - Suero Bovino Fetal

SDS - Dodecilsulfato sódico

S255 – Serina 255

S262 – Serina 262

S279 – Serina 279

S282 – Serina 282

TEF - Tampón de electroforesis

TEM - Transición epitelio mesénquima

TEMED - Tetrametiletilendiamina

TNF-alfa - Factor de necrosis tumoral alfa

TOF - Tiempo de vuelo

Tris - Trisaminometano

Tub - Tubulina

UC - Uniones comunicantes

V - Voltios

VE - Vesículas extracelulares

V600E - Sustitución de valina a ácido glutámico en la posición 600 de BRAF

V600K - Sustitución de valina a lisina en la posición 600 de BRAF

µg - Microgramos

µL - Microlitros

µm – Micrómetros

Resumen

Diferentes tipos de cáncer como es el caso del melanoma, se caracterizan por la pérdida de la comunicación intercelular mediante uniones comunicantes (UCs) y/o la regulación negativa de conexinas (Cxs). Las Cxs se han descrito como factores supresores de tumores en etapas tempranas del melanoma. Sin embargo su papel es controvertido durante la invasión de células tumorales y el proceso de metástasis. Las vesículas extracelulares y los exosomas liberados por las células participan en la comunicación celular y en la progresión tumoral. La proteína transmembrana conexina 43 (Cx43) puede formar parte de los exosomas y participa en la transferencia de información entre la célula diana y el exosoma a través de UCs. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la función de la Cx43 a nivel exosomal en progresión tumoral en melanoma. Los resultados de este trabajo indicaron que la Cx43 está presente en exosomas derivados de las células de melanoma que expresan de forma ectópica la Cx43 (A375-vCx43). La Cx43 a nivel exosomal disminuyó la proliferación celular y el crecimiento de colonias de líneas celulares de melanoma metastásico. El análisis del componente proteico de exosomas positivos y negativos para la Cx43 mediante espectrometría de masas mostró un cambio en la función de la partícula exosomal en presencia de la Cx43. Los resultados indican que la Cx43 a nivel exosomal, a través de su función de andamiaje, podría estar involucrada en el reclutamiento de proteínas y otras moléculas hacia los exosomas, cambiando su función en el progreso de melanoma. Una mayor comprensión del papel de Cx43 a nivel exosomal podría repercutir positivamente en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir el melanoma metastásico.

Resumo

Sábese que a perda da comunicación intercelular mediante unións comunicantes (UCs) e/ou a regulación negativa das conexinas (Cxs), dáse en diferentes tipos de cancro, incluído o melanoma. As Cxs describíronse como supresores tumorales en estadio temperado do melanoma. Namentres, durante a invasión das células tumorales e a metástase, o seu papel é controvertido. As vesículas extracelulares e os exosomas liberados polas células, participan na comunicación celular e poden participar na progresión tumoral. A proteína transmembrana conexina 43 (Cx43) foi atopada nos exosomas e participa na transferencia de información á célula diana a través de UCs. O obxectivo principal deste traballo foi coñecer o papel da Cx43 presente nos exosomas de liñas de melanoma durante a progresión tumoral. Os resultados amosaron que a Cx43 só estaba presente nos exosomas derivados das células de melanoma con expresión ectópica para a Cx43 (A375-vCx43). Cando se expuxeron diferentes liñas celulares de melanoma á Cx43 exosomal, estas vesículas diminuíron a proliferación celular e o crecemento de colonias. A análise das proteínas presentes nos exosomas das liñas positiva e negativa para a Cx43 mediante espectrometría de masas indicou que a Cx43 a nivel exosomal a través da súa función de andamio podería estar implicada no recrutamento de proteínas e outros compostos cara os exosomas, cambiando o seu papel no progreso do melanoma. Unha maior comprensión do papel da Cx43 nos exosomas terá implicacións para o desenvolvemento de novas estratexias terapéuticas para combater a metástase no melanoma.

Abstract

Loss of gap junction intercellular communication (GJIC) and/or downregulation of connexins (Cxs) have been reported in different cancer types including melanoma. Cxs have been described as tumor suppressors in earlier stages of melanoma. However during tumor cell invasion and metastasis their role is still controversial. Extracellular vesicles (EVs) and exosomes released by cells participate in cell communication and can be involved in tumor progression. The transmembrane protein connexin43 (Cx43) was found in exosomes and participate in the transfer of information to the target cell through gap junctions (GJs). The aim of this work was to study the role of the Cx43 in exosomes in melanoma progression. Cx43 was only present in exosomes derived from melanoma cells expressing ectopic Cx43 (A375-vCx43). When different melanoma cell lines were exposed to exosomal Cx43, these vesicles decreased cell proliferation and blocked colonies grown. The analysis of protein content of the exosomes positive and negative for Cx43 was carried out by mass spectrometry. Our results indicated that exosomal Cx43 through its scaffolding function may be involved in the recruitment of proteins and other molecules to the exosomes switching the role of these EVs in melanoma progression. Further understanding of the role of Cx43 in the exosomes will have important implications in order to combat metastasis in melanoma.

1. Introducción

El intercambio de información entre dos células en contacto ocurre principalmente a través de uniones comunicantes (UC) o *Gap Junctions*. Este tipo de comunicación está mediada en vertebrados por las proteínas denominadas conexinas (Cxs). En invertebrados, las proteínas responsables de la formación de este tipo de canales de comunicación intercelular se denominaron inexas¹. En humanos se han descrito 21 tipo de Cxs, detectándose expresión de alguna isoforma en prácticamente todos los tejidos². En el año 2000, Panchin *et al.*³ describieron unas proteínas que presentaban homología de secuencia aminoacídica con las inexas y de estructura con las Cxs, a las que denominaron panexas (Panxs). Se han descrito tres miembros de esta familia: la Panx1, Panx2 y Panx3⁴. Aunque existe controversia en el campo, se ha descrito que las Pxs son capaces de formar hemicanales pero no UCs¹.

Las Cxs constituyen una familia de proteínas transmembrana implicadas en comunicación celular a través de canales de membrana, de vesículas extracelulares (VEs) y de nanotubos⁵. Hoy en día se siguen nombrando en función de su peso molecular; por ejemplo la conexina 43 (Cx43), tiene un tamaño de ~ 43 kDa. De las 21 isoformas de Cxs, 10 de ellas, incluyendo la Cx43 y la Cx26, se expresan en la epidermis humana^{1,6}. Estas proteínas se sintetizan en el Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) y viajan al Aparato de Golgi (AG) donde oligomerizan para ser transportadas a la membrana plasmática en forma de canales, donde se insertan para ejercer su función. En varios trabajos se ha sugerido que estos canales se insertan también en membranas de componentes subcelulares como, por ejemplo, en la mitocondria⁷.

Seis conexinas oligomerizan para formar un canal denominado conexón o hemicanal (**Figura 1**). Los conexones que se encuentran formados por un

único tipo de Cx se denominan conexones homoméricos, mientras que los conexones conformados por más de un tipo de Cx se denominan heteroméricos⁸. El acoplamiento entre dos conexones de dos células adyacentes (o entre una célula y una vesícula extracelular)⁵ da lugar a la UC. Las UCs pueden estar formadas por dos conexones de la misma composición y son conocidas como homotípicas. Cuando los conexones tienen diferente composición (isoformas) forman un canal heterotípico⁸. Los hemicanales son los canales encargados del intercambio de información entre la célula y su entorno⁹. A través de estos canales o a través de las UCs, las células son capaces de intercambiar iones, metabolitos, pequeñas moléculas de ARN como microARNs (miARN), segundos mensajeros, glutamato, ATP, etc¹.

Las Cxs y las Panxs son proteínas transmembrana formadas por 4 dominios transmembrana, 2 dominios extracelulares, 3 dominios intracelulares, entre los que se encuentra un dominio en forma de bucle o “loop”, el dominio C-terminal y el dominio N-terminal¹⁰.

La piel está formada por tres capas diferenciadas de distinto origen embrionario, siendo la zona más externa la epidermis, seguida de la dermis y la hipodermis¹¹. La expresión de las Cxs en las diferentes capas de la piel ocurre de forma temporal y espacial (**Figura 2**). La Cx43 se expresa en

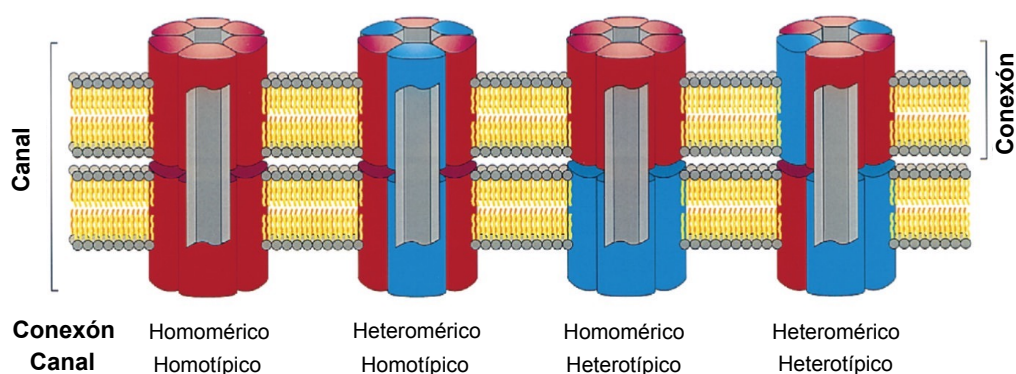


Figura 1. Canales formados por diversos tipos de conexones y UCs. Imagen obtenida y adaptada de Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. Cell. 1996;84(3):381-8.

todas las capas de la epidermis, mientras que otros tipos de Cxs únicamente se localizan en un único estrato¹².

La Cx43 además de formar canales en la membrana citoplasmática y probablemente en la membrana de otros orgánulos celulares, regula la expresión génica a través del elemento de respuesta a conexinas (ERCx) y Sp1/Sp3. Esta proteína tiene la capacidad de actuar como proteína de andamiaje, regulando diferentes vías de señalización por secuestro de otras proteínas en la membrana y liberación hacia el núcleo. Las funciones de formar canales de comunicación intercelular, de andamiaje y control de la expresión génica están implicadas en la función supresora de tumores que ejerce la Cx43 en determinados tipos de cáncer, como es el caso del melanoma^{13,14}.

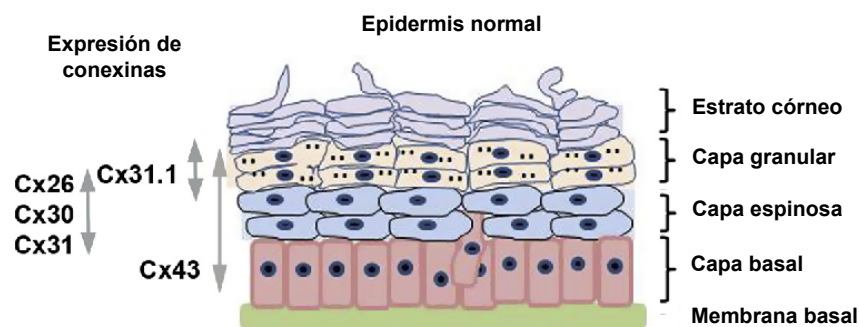


Figura 2. Patrón de expresión de las Cxs en la epidermis. La Cx43 se expresa en todas las capas de la epidermis. Imagen obtenida y adaptada de Martin PE, Easton JA, Hodgins MB, Wright CS. Connexins: sensors of epidermal integrity that are therapeutic targets. FEBS Lett. 2014;588(8):1304-14.

El melanoma metastásico es un tipo de cáncer altamente agresivo cuya incidencia sigue aumentando a día de hoy en todo el mundo¹⁵. Es el tumor responsable del 80% de las muertes por tumores malignos de la piel¹. El melanoma se encuentra dentro de los 10 tipos de tumores más frecuentes en Europa, siendo más frecuente en mujeres que en hombres. Presenta una alta capacidad metastásica que ocurre desde las primeras etapas de la enfermedad junto con el desarrollo de resistencia a tratamientos y terapias

dirigidas, lo que hacen del melanoma maligno una condición incurable y mortal a día de hoy.

El melanoma se desarrolla por la transformación maligna de los melanocitos, que son las células epidérmicas encargadas de la producción de melanina. Los melanocitos están localizados en la membrana basal de la epidermis, y su crecimiento está controlado por los queratinocitos circundantes, en cuyo control participan los canales de Cxs¹⁷. Actualmente, entre un 50-60% de los pacientes con melanoma presentan mutaciones en BRAF, mientras que un 15% presentan mutaciones en NRAS¹⁸.

Entre las estrategias para el tratamiento del melanoma, destaca el tratamiento basado en mutaciones en la quinasa B-Raf (BRAF), que sobreactiva la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)⁵, favoreciendo la progresión tumoral en una amplia mayoría de melanomas, así como en otro tipo de tumores BRAF mutado. Entre las mutaciones BRAF identificadas en cáncer humano destaca una sustitución de valina (V) a ácido glutámico (E) en la posición 600 de BRAF (V600E), dentro del dominio de activación de la quinasa¹⁹. La mutación V600E representa entre el 80-90% de las mutaciones BRAF detectadas en cáncer y está asociada con un mal pronóstico. Otras mutaciones incluyen cambios por una lisina (V600K). Este tipo de mutaciones desencadena en la activación constitutiva de la ruta de señalización de la MAPK/ERK (RAS-RAF-MEK-ERK) en ausencia de citoquinas, hormonas o factores de crecimiento (que activan los receptores de las tirosina quinasas y otros receptores en membrana), desencadenando un incremento de la proliferación celular y cáncer²⁰.

En el año 1966 se describió que las células tumorales no eran capaces de comunicarse a través de UCs, sin embargo hoy día se sabe que esto depende del tipo de tumor y etapa del mismo²¹. En el caso del melanoma, la Cx43 parece estar implicada en la supresión tumoral, sin embargo existe

cierta controversia en el campo, especialmente durante el proceso de metástasis^{13,14}.

Entre las modificaciones postraduccionales (MPTs) que sufre la Cx43, destaca la fosforilación de la proteína por la MAPK en diferentes residuos de serina (S255/S262/S279/S282). Dichas fosforilaciones afectan a la estabilidad de la proteína, afectando a la actividad de las UCs y al control de la proliferación, migración celular y en algunos casos, de forma independiente, a la actividad de los canales por interferencia en la interacción del dominio C-terminal de la Cx43, con proteínas implicadas en control de proliferación, migración y desdiferenciación celular²¹.

Los exosomas son pequeñas vesículas liberadas por las células y caracterizadas por tener un tamaño de 30 a 100 nm de diámetro²². La secreción de exosomas o vesículas extracelulares (VEs) es un proceso altamente controlado, conocido como exocitosis²³. Las VEs son partículas estables y se han detectado en diversos fluidos corporales como la orina y la sangre y además, también se encuentran en el medio de células en cultivo²³. Los exosomas transportan moléculas como proteínas, ácidos nucleicos (ARN y ADN), lípidos y otros componentes que pueden modificar la señalización celular y metabolismo en las células receptoras²⁴. Durante la progresión tumoral la información que llevan estas partículas se ha relacionado con la “educación” de células de la médula ósea para escapar del sistema inmune y fomentar la formación del nicho pre-metastásico²². Estudios recientes han demostrado que la presencia de Cx43 en exosomas podría aumentar la eficacia de la terapia al dirigir el exosoma hacia la célula diana²⁵. Se ha descrito que la Cx43 favorece la internalización de estas vesículas por las células receptoras y además, permite el intercambio de componentes como péptidos, pequeñas moléculas de ADN o ARN con la célula receptora a través de UC sin necesidad de internalizarse, contribuyendo a la complejidad funcional de estas vesículas²⁶. Además, la actividad de andamiaje de la Cx43 podría también estar implicada en el

reclutamiento y anclaje de proteínas y moléculas de ARN o ADN al exosoma, cambiando su composición y por tanto modificando su función²⁶.

En este trabajo de fin de máster se ha estudiado el papel de la Cx43 a nivel exosomal en líneas celulares de melanoma. Los resultados sugieren que la presencia de la Cx43 en las partículas exosomales dota a las mismas de una capacidad supresora de metástasis.

2. Objetivos

2.1. Estudiar el papel de la Cx43 a nivel exosomal durante la progresión del melanoma metastásico.

2.2. Caracterizar el componente proteico de las vesículas extracelulares y exosomas aislados de células de melanoma metastásico con y sin Cx43.

3. Material y Métodos

3.1. Cultivo de líneas celulares

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron las líneas de melanoma humano A375, SK-MEL-28, SK-MEL-103 y SK-MEL-147. Las líneas se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% penicilina/streptomicina (P/S). La línea A375 es una línea de melanoma maligno extraída de una mujer de 54 años, y presenta una mutación en el gen BRAF. La línea SK-MEL-28 ha sido extraída de un hombre de 51 años, con mutación en el gen BRAF. Por el contrario, la línea SK-MEL-103 y SK-MEL-147 presentan una mutación en el gen NRAS. Las células de melanoma se incubaron en estufas de cultivo a 37 grados centígrados (°C) al 5% de CO₂ y saturación de humedad.

3.2. Inmunofluorescencia

Las células fueron cultivadas sobre unos cubreobjetos denominados *coverslips* hasta alcanzar la confluencia. Se lavaron con suero fisiológico atemperado para retirar los restos de medio de cultivo y posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 4% frío. Se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se mantuvieron en frío. Se añadió glicina 0.1 M durante 10 minuto (min) a temperatura ambiente para bloquear la autofluorescencia del paraformaldehído. Las membranas fueron permeabilizadas con 0.1-0.25% de Triton X-100 en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Después de la permeabilización se añadió albúmina de suero bovino (BSA) al 1% + PBST (PBS + Tween 0.1%) durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear uniones inespecíficas. A continuación se añadió el anticuerpo primario anti-Cx43 a una concentración de 1:200 (*Polyclonal Anti-Connexin43 antibody produced in rabbit, Ref: C6219-100UL; Sigma-Aldrich*), durante 1h a temperatura

ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno y se añadió el anticuerpo secundario a una concentración de 1:100 (*Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, FITC, Ref: F-2765; Sigma-Aldrich*) durante 1h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se hicieron 3 lavados con PBS. Como control negativo se añadió anticuerpo secundario pero no primario. Por último se tiñeron los núcleos con un marcador fluorescente a una concentración 1:5000 (*DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato), Ref: D9542; Sigma - Aldrich®*) durante 5 min, antes de montarlas con glycergel (*Dako Glycergel Mounting Medium, Ref: C0563; Agilent*).

3.3. Co-Inmunoprecipitación de proteínas (CoIP)

Se siguió el protocolo publicado por Nelson *et al.* en 2006²⁷ para la realización de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*), ajustado al estudio de interacciones de proteínas (Co-IP). Las células fueron fijadas para bloquear las uniones entre proteínas (*Cross-linking* o entrecruzamiento) con formaldehído al 1 %, durante 15 min a temperatura ambiente, y posteriormente con glicina 0,125 M durante 10 min. Las células se recogieron mediante centrifugación (1500 rpm, 5 min, 4°C) y se lavaron dos veces con PBS. El pellet celular se resuspendió en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, NP-40 0,5% vol/vol, Triton X-100 1% vol/vol, NaCl 150 mM), al que se le añadieron previamente inhibidores de proteasas (*Ref: p8340; Sigma-Aldrich*) y PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride; Sigma-Aldrich*) 0.1 mM. Se utilizaron partículas de agarosa con proteína G unida (*Protein G Plus – Agarose Ref sc-2002; SantaCruz Biotechnology, EEUU*) como soporte sólido. Para eliminar posibles uniones inespecíficas a la proteína G, los lisados celulares en tampón de lisis con inhibidores de proteasas y PMSF se incubaron con proteína G - agarosa al 2,5% durante una hora a 4°C en rotación. Se dio un pulso en la centrífuga a 2000 rpm y se desechó el pellet con la proteína G - agarosa con posibles uniones inespecíficas. El sobrenadante se correspondía con el extracto celular total (ECT), del que se guardó una alícuota de 50 µl a -80°C. El resto

del extracto se incubó durante 2 h a 4°C en rotación con 5 µg del anticuerpo anti-CTD-Cx43 (IP+) (*Polyclonal Anti-Connexin43 antibody produced in rabbit Ref C6219-100UL; Sigma-Aldrich*). Se añadió proteína G - agarosa al 2,5% previamente lavadas 3 veces con una solución de PMSF y se incubaron durante 1 hora a 4°C en rotación. Como control negativo se realizaron IPs en las mismas condiciones pero sin añadir el anticuerpo de anti-CTD de la Cx43 (IP-). Los pellets fueron lavados entre 5-6 veces con tampón de lisis-IP. Finalmente fueron resuspendidos en tampón de carga 1X (**Tabla 2**) y calentados a 37°C durante 30 min, recogiendo el sobrenadante. A las partículas de agarosa restantes se les añadió otra vez tampón de carga, y se incubaron a 95°C durante 10 min para eliminar las uniones más fuertes. Se juntaron ambos sobrenadantes y se guardaron a -80°C.

3.4. Tinción con plata

La tinción de plata es una técnica que se utiliza para la detección de proteínas totales y comparación de niveles entre distintos extractos. Para ello se realizó una electroforesis desnaturalizante en el gel poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1.0 mm de grosor al 10% de acrilamida/bisacrilamida (*Sigma-Aldrich*) (**Tabla 2**). La electroforesis se llevó a cabo a 80 voltios (V) en una cubeta de electroforesis (*Bio-Rad*) con tampón de electroforesis 1X (TEF) (**Tabla 1**). Inicialmente el gel se fijó durante 30 min con el fijador (**Tabla 1**). Posteriormente se lavó dos veces con agua destilada durante 10 min para rehidratar el gel. Se incubó 1 min con el sensibilizador (**Tabla 1**) y se procedió a realizar dos lavados de 1 min, antes de llevar a cabo la tinción con la solución de plata durante 30 - 60 min. Tras un lavado con agua destilada de 1 min, el gel fue revelado con la solución reveladora (**Tabla 1**), la cual permite que se aprecien las bandas de proteínas. Para parar el revelado, se incubó el gel con la mezcla stop (**Tabla 1**) durante 30 min.

Tabla 1. Reactivos gel plata. Volumen final de 50 mL.

Fijador	Sensibilizador	Reactivo de Plata	Revelador	Stop
Etanol absoluto (20 ml)	Tiosulfato de sodio 10% (100 µL)	Plata (0,1 g)	Na ₂ CO ₃ (1,5 g)	Tris-Base (1,5 g)
Acético glacial (5 ml)	H ₂ O (50 ml)	Formaldehído 37% (37 µL)	10% (6,25 µL)	Acético glacial (5 ml)
H ₂ O (25 ml)		H ₂ O (50 ml)	Formaldehído 37% (12,5 µL)	H ₂ O (45 ml)
			H ₂ O (50 ml)	

3.5. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se realizó mediante una electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) de 1.0 mm de grosor. Se utilizaron geles al 10% de acrilamida/bisacrilamida (*Sigma-Aldrich*). Las distintas cantidades de muestra fueron tratadas con tampón de carga 1X (**Tabla 2**) y posteriormente calentadas durante 10 min a 100°C. Una vez fueron cargadas las proteínas en el gel, la electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el procedimiento del gel de plata anteriormente descrito.

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (*Immobilon®-P Polyvinylidene difluoride membranes*, Ref: P2938; *Sigma-Aldrich*) previamente activada durante 5 min en metanol y agua, dos veces respectivamente. Tras la activación de las membranas, se procedió al equilibrado, en el que las membranas y las esponjas de transferencia se mantuvieron en una cubeta con tampón de equilibrado (**Tabla 2**) durante 15 min a 4°C. Posteriormente, se llevó a cabo la transferencia semi-húmeda, a 20 V durante 1 hora (h) utilizando el aparato *TransBlot-semi-dry Transfer Cell* (*BioRad*). Las membranas se incubaron 10 min con solución rojo Ponceau (*ATX Ponceau S red staining solution*, Ref: 09189; *Sigma-Aldrich*), para teñir las proteínas presentes en el lisado celular y tomar como

control de transferencia. Las membranas se incubaron en una solución de bloqueo (**Tabla 2**) en agitación y a temperatura ambiente durante 1 h, para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se dejaron incubando toda la noche a 4°C en presencia de los anticuerpos anti-Cx43 en una concentración 1:1000 (*Polyclonal Anti-Connexin43 antibody produced in rabbit Ref C6219-100UL; Sigma-Aldrich*), anti-CD9 en una concentración 1:250 (*Polyclonal Anti-CD9 produced in rabbit (H-110) Ref sc-914; Santa Cruz Biotechnology*) y anti-CD63 a una concentración de 1:250 (*Polyclonal Anti-CD63 produced in rabbit (H-193) Ref sc-1536; Santa Cruz*), anti-tubulina (*Monoclonal Anti- α -Tubulin antibody produced in mouse Ref T9026-100UL; Sigma-Aldrich*) en una concentración 1:10000, preparados en una solución con tampón de lavado 1X y solución de bloqueo. Las membranas incubadas con anti-tubulina se utilizaron como control de carga junto con la tinción rojo ponceau de la membrana. Tras incubar toda la noche, las membranas se lavaron 4 veces durante 15 min en un tampón de lavado 1X (**Tabla 2**) para eliminar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Las membranas (anti-Cx43, anti-CD63 y anti-CD9) se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (*Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat, Ref: A4914; Sigma Aldrich*), y la membrana con anti-tubulina se incubó con el secundario anti-ratón (*Mouse IgG HRP Linked Whole Ab, Ref: GENA931; Sigma-Aldrich*). La incubación del anticuerpo secundario se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la segunda incubación, se lavaron las membranas 4 veces durante 15 min con un tampón de lavado 1X. Las proteínas fueron reveladas con un kit de quimioluminiscencia (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Ref: 32106; Thermo Scientific*) en la cámara *Amersham Imager 600 imagers (Life Sciences)*.

Tabla 2. Composición de dos geles de poliacrilamida y de los tampones utilizados para la detección de proteínas en membranas de nitrocelulosa. SDS (dodecilsulfato sódico), PSA (persulfato amónico).

Componente	Gel Separador al 10%	Gel Concentrador
Acrilamida / Bisacrilamida 30%	3,33 mL	400 µL
Agua	4,64 mL	2,2 mL
Tris 2M pH 8.	1,88 mL	375 µL
SDS 10%	100 µL	30 µL
PSA 20%	25 µL	12 µL
TEMED	12 µL	3 µL

Composición

Tampón de Carga 1X	10% SDS; 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 50% Glicerol; 0,1% Azul de bromofenol; 10% β-mercaptoetanol
Tampón de Electroforesis (TEF)	30,3 g Tris-Base; 144 g Glicina; 10 g SDS; pH 7,5 (Volumen final de 1 L.
Tampón de Equilibrado	20% metanol; TEF 10X, agua destilada
Tampón de Lavado 10X	2 mM Tris-Base; 150 mM NaCl
Tamón de Lavado 1X	Tampón de lavado 10X; 0,05% Tween™ al 20%
Solución de Bloqueo	5% leche (Ref 70166-500G; Sigma) en tampón de lavado 1X

3.6. Aislamiento de exosomas

Para el aislamiento de exosomas las células fueron cultivadas con DMEM suplementado con 10% SBF y 1% P/S, hasta a un 70% de confluencia. Posteriormente fueron lavadas con PBS estéril 3 veces para eliminar los posibles exosomas procedentes del SBF y se añadió un nuevo medio sin suero (NS). Las células se cultivaron con este nuevo medio durante 48 h. Las células se levantaron y se realizó un conteo en la cámara Neubauer para conocer el número total de células productoras de exosomas. El medio

de cultivo de estas células se recogió y centrifugó a 2000 rpm durante 10 min para eliminar restos celulares, y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,22 micrómetros (μm). El sobrenadante filtrado se ultracentrifugó a 36800 rpm durante 1h y 30 min a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Optima L-90K, rotor 70Ti). El pellet de exosomas se recogió en medio de cultivo, PBS o buffer de lisis, dependiendo de su posterior uso.

3.7. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó con TRIzol® Reagent (*Invitrogen, EEUU*) siguiendo las indicaciones del fabricante. La adición de cloroformo (*Sigma, EEUU*) seguida de una centrifugación (12.000 rpm, 15 min, 4°C) separó la muestra en dos fases, una fase acuosa y otra orgánica. El ARN que se encuentra en la fase acuosa fue recuperado por precipitación con alcohol isopropílico (*Sigma, EEUU*), centrifugando a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C. Para evitar la posible contaminación con ADN, las muestras fueron tratadas con con ADNasa 1 U/ μL (*DNase I, RNase-free (supplied with MnCl₂) Ref. EN0525; Thermo Scientific*) durante 15 min a 37°C, y posteriormente se añadió 0,5 M de EDTA durante 15 min a 65°C, para inactivar la ADNasa. Para estimar la pureza de la extracción se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. La calidad y cantidad de la muestra se determinó calculando la proporción (ratio) entre la absorbancia a 260 nanómetros (nm) y a 280 nm (ratio de 2 para ARN puro), y entre 260 nm y 230 nm, > 2 como índice de calidad.

3.8. Retrotranscripción de ARN

Para la retrotranscripción de ARN, se utilizó el kit *Superscript® Vilo cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)* y 1 μg de ARN por muestra. En el termociclador AB Sciences (*Applied Biosystems*), el ARN se desnaturalizó a 65°C durante 10 min, para eliminar posibles estructuras secundarias. La retrotranscripción se llevó a cabo siguiendo el programa: 25°C – 10 min, 42°C – 90 min, 85°C – 5 min y 4°C. El ADN complementario (ADNc) fue

diluido 1:100 en agua libre de nucleasas y proteasas (*Water, Ref: W4502; Sigma-Aldrich*) para el análisis de la expresión génica por RT-PCR.

3.9. Análisis de la expresión génica

Para el análisis de la expresión génica se llevó a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Se llevó a cabo la reacción con 5 µL de ADNc (diluido previamente 1:100), 5µL de la mezcla de cebadores y 10 µL de SYBR Green (*PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, Ref: A25776: Sigma-Aldrich*) en un termociclador a tiempo real (*LightCycler® 480 System, Roche*). Los cebadores utilizados se indican en la **Tabla 3**. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: una activación de 10 min a 95°C, amplificación de 45 ciclos de 30 segundos (s) a 95°C con 1 min a 60°C, y un enfriamiento de 20 s hasta alcanzar los 4°C.

Tabla 3. Cebadores sentido y antisentido utilizados para el análisis de la expresión de Cx43 (GJA1) y HPTR (HPRT1) mediante RT-PCR.

Gen	Proteína	Oligo	
GJA1	Cx43	S	ACATGGGTGACTGGAGCGCC
		AS	ATGATCTGCAGGACCCAGAA
HPRT1	HPRT	S	TTGAGTTTGGAAACATCTGGAG
		AS	GCCCAAAGGGAAGTATAGTC

3.10. Transfección mediante electroporación

Para inducir la sobreexpresión de Cx43 en las líneas celulares utilizadas en este trabajo, se realizó una transfección con un vector (*pIRES-puro2*) que contiene el gen de la Cx43 (GJA1) bajo el promotor del CMV (citomegalovirus), cedido generosamente por la Dr. Arantxa Tabernero (*Instituto de Neurociencia Castilla y León*). La transfección se llevó a cabo mediante electroporación con el equipo *Nucleofector™ 2b* (Lonza) y el *Cell Line Nucleofector™ Kit V* (Ref: VCA-1003; Lonza). Se utilizaron 1 millón de células, las cuales fueron levantadas, resuspendidas en medio DMEM

suplementado con 10% SBF y 1% P/S y centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 100 μ L de *Nucleofector Solution* y repartido en tubos Eppendorf. Posteriormente se añadieron 3 μ g de ADN plasmídico y el contenido de cada Eppendorf se pasó a una cubeta de electroporación. Para llevar a cabo la transfección, se aplicó el programa U-28 en una cubeta en el Nucleofector™ 2b. Al finalizar, se añadieron 500 μ L de medio de cultivo previamente atemperado, y las células electroporadas se recogieron y sembraron en una placa de 6 pocillos en la que previamente se había añadido 1.5 mL de medio atemperado. A las 24h, se añadió DMEM suplementado con puromicina 0,5 μ g/mL para seleccionar las células transfectadas con el vector de la Cx43 que expresa la puromicina.

3.11. Formación de colonias

Para el ensayo de formación de colonias fueron sembradas 5000 células de la línea tumoral de interés en placas de 6 pocillos. El medio de cultivo fue renovado cada 48h durante una semana. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% frío, y posteriormente teñidas con violeta de cresilo.

3.12. Ensayo de herida

Para comprobar que la localización de la Cx43 en las células es funcional, se llevó a cabo un ensayo de herida o *Scrape loading*. Para ello las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 90%. Las células fueron lavadas con PBS a 37°C y posteriormente se añadió una solución al 0.4% del colorante fluorescente Lucifer Yellow (LY) (Ref: ACE-25-LY; Cell Projects Ltd UK) en PBS. Posteriormente se hizo una herida en cada pocillo de la placa de cultivo con ayuda de una aguja o un bisturí. Tras la incubación con el LY durante 3 a 37°C, se lavaron con DMEM N/S, y fueron fijadas con formaldehído al 4%. La transferencia de LY se evaluó en un microscopio fluorescente *Nikon Eclipse Ti*.

3.13. Análisis del componente proteico mediante espectrometría de masas.

Los exosomas aislados de las líneas celulares A375 y A375 que sobreexpresa la Cx43 (A375-vCx43) fueron sometidas a un análisis del componente proteico para identificar y comprobar qué proteínas estaban presentes en los exosomas. Para el análisis proteico de las muestras se utilizó el espectrómetro de masas LC-MS/MS 6600 triple TOF y la fuente de ionización de desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) dentro del servicio de la plataforma de proteómica del IDIS en Santiago de Compostela. Sólo se han tenido en cuenta aquellas proteínas identificadas con un FDR (tasa de falsos positivos) del 1% de error. En el caso de los exosomas positivos para Cx43, se seleccionaron las que presentaban un FDR mayor de 0,65, y un FDR superior a 0,71 para los exosomas negativos para Cx43. Se indicaron los valores de *unused*, *coverage* y *número de péptidos*. *Unused* refleja los péptidos identificados únicamente relacionados con esa proteína. *Coverage* es el porcentaje de la secuencia de aminoácidos de la proteína que es cubierta por los aminoácidos identificados por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Se indica el número de péptidos obtenidos por MS/MS que han servido para identificar una proteína.

3.14. Ontología de genes

Para el análisis de los datos de espectrometría de masas (MS) y representación con los términos de ontología de genes (OG), los datos fueron analizados utilizando *GO Enrichment Analysis*. Este programa está conectado con la herramienta *PANTHER Classification System (PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements)*. El análisis de los datos también se llevó a cabo con la herramienta *STRING*.

4. Resultados

4.1. Sobreexpresión de la Cx43 en melanoma

La línea de melanoma metastásico A375 fue transfectada mediante electroporación con el vector pIRES puro 2 que expresa el gen de la Cx43 bajo el promotor del citomegalovirus (CMV). La expresión de la Cx43 bajo el promotor del CMV, incrementó los niveles de ARN y los niveles de la proteína detectada por RT-qPCR y western blot respectivamente (**Figura 3.a**). En la **Figura 3.a** se muestran los resultados de los bajos niveles de expresión de la Cx43 (ARNm) en la línea A375, y de la misma línea pero transfectada con el vector para sobreexpresar la Cx43 (A375-vCx43).

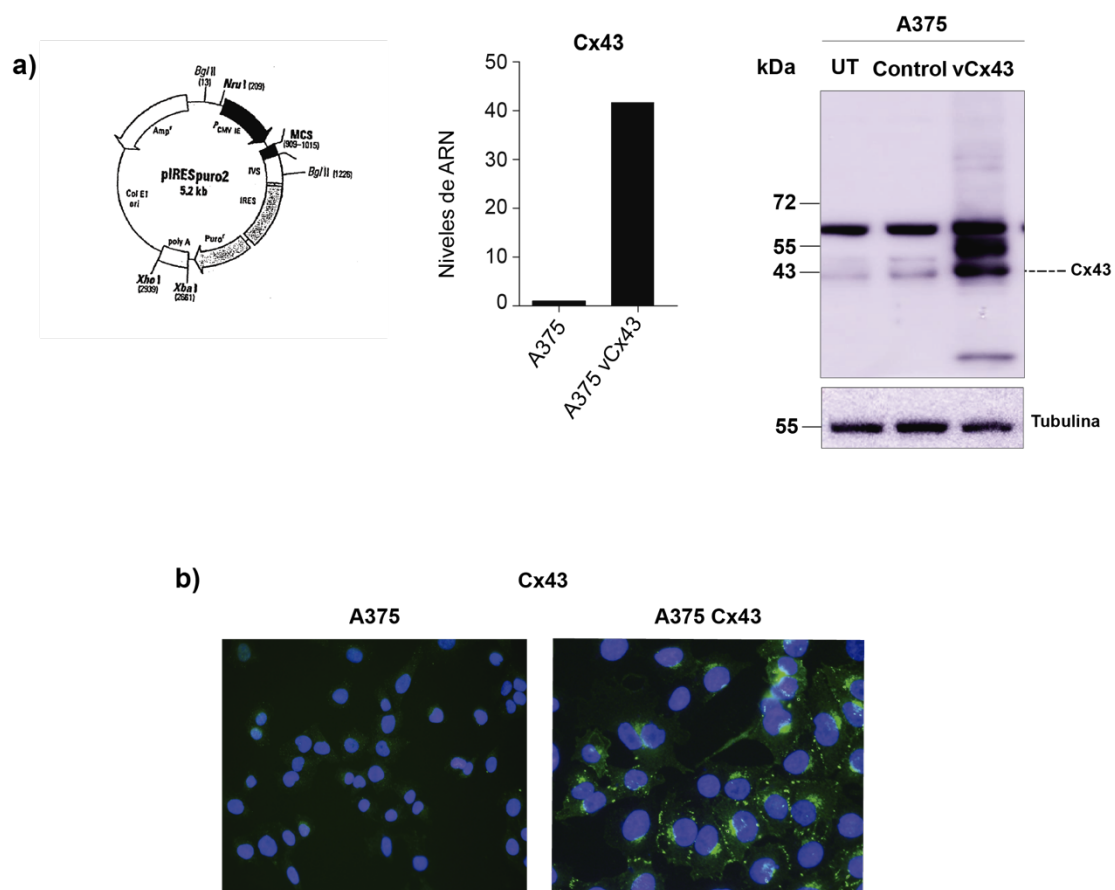


Figura 3. Sobreexpresión de Cx43 en la línea de melanoma metastásico A375 mediante el vector pIRES puro 2. a) Expresión de Cx43 a nivel de ARNm en las líneas A375 y A375pCx43. Patrón de expresión de la Cx43 por Western-Blot de A375, A375 pCont y A375pCx43. Se utilizó la tubulina como control de carga. b) Localización celular de la Cx43 por inmunofluorescencia, con las líneas A375 y A375pCx43.

El análisis de western blot indica que la línea de origen y la línea transfectada con el vector control (sin el gen de la Cx43), contienen la Cx43 modificada, detectándose bandas de alto peso molecular y sin observarse a penas la banda de 43 kDa de la forma no modificada de la proteína. En la línea A375-vCX43 se detectaron diferentes formas de Cx43 modificada, incluida la forma de 55 kDa, pero principalmente la banda de 43 kDa correspondiente a la Cx43 no modificada. A continuación se realizó una inmunofluorescencia para estudiar la sublocalización celular de la Cx43 en la línea A375-vCx43 (**Figura 3.b**). Como se indica en la imagen, la Cx43 se localiza principalmente en la membrana celular y alrededor del núcleo, probablemente en el RE o en el aparato de Golgi. En la línea A375 como se esperaba, a penas se detectó Cx43, no detectándose en membrana y con localización principalmente citoplasmática.

Para comprobar si la localización en membrana de la Cx43 en la nueva línea celular estaba relacionada con la formación de UCs funcionales, se llevó a cabo un ensayo de herida, denominado *scrape loading* en inglés. (**Figura 4**). En la línea A375-vCx43 se observó una mayor transferencia de LY a entre células en contacto, en comparación con la línea A375.

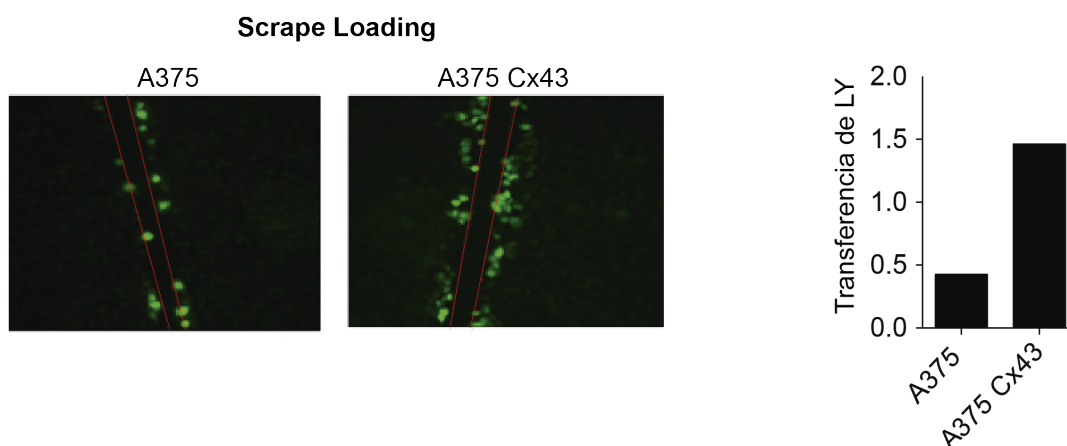


Figura 4. Medida de la transferencia de LY mediante Scrape Loading con las líneas A375 y A375-vCx43 para estudiar la actividad de las UCs.

4.2. Aislamiento y caracterización de exosomas aislados de líneas de melanoma con altos niveles de expresión de Cx43

Los exosomas de la línea A375 y de la línea que sobreexpresa la Cx43 (A375-vCx43) fueron aislados mediante ultracentrifugación como se indica en la sección de métodos. Los exosomas aislados fueron visualizados mediante microscopía electrónica de transmisión y con partículas de oro (**Figura 5**). Como se muestra en la imagen de la **Figura 5**, se detectaron agregados de exosomas y exosomas libres con el tamaño esperados implicadas en la progresión y protección de melanoma²⁸. La caracterización del tamaño de estas partículas se hizo con medidas en el *Zetasizer Nano Z*. Como se indica que la **Figura 5.c**, en las muestras analizadas se detectaron tamaños de partículas entre 20 y 100 nm. La presencia de la Cx43 en exosomas se estudió mediante western blot. Los exosomas procedentes de la línea A375-vCx43 mostraron niveles elevados Cx43, mientras que los exosomas de la línea A375 carecen de dicha proteína (**Figura 6.a**). Los resultados de estos ensayos mostraron que la Cx43 en exosomas se encuentra fundamentalmente en su forma nativa, con pocas bandas de alto peso molecular que indican modificaciones postraduccionales entre las que se incluyen la SUMOilación y ubiquitinación. Únicamente se detectan bandas superiores a la de 43 kDa, que se corresponderían con formas fosforiladas de la Cx43²⁹.

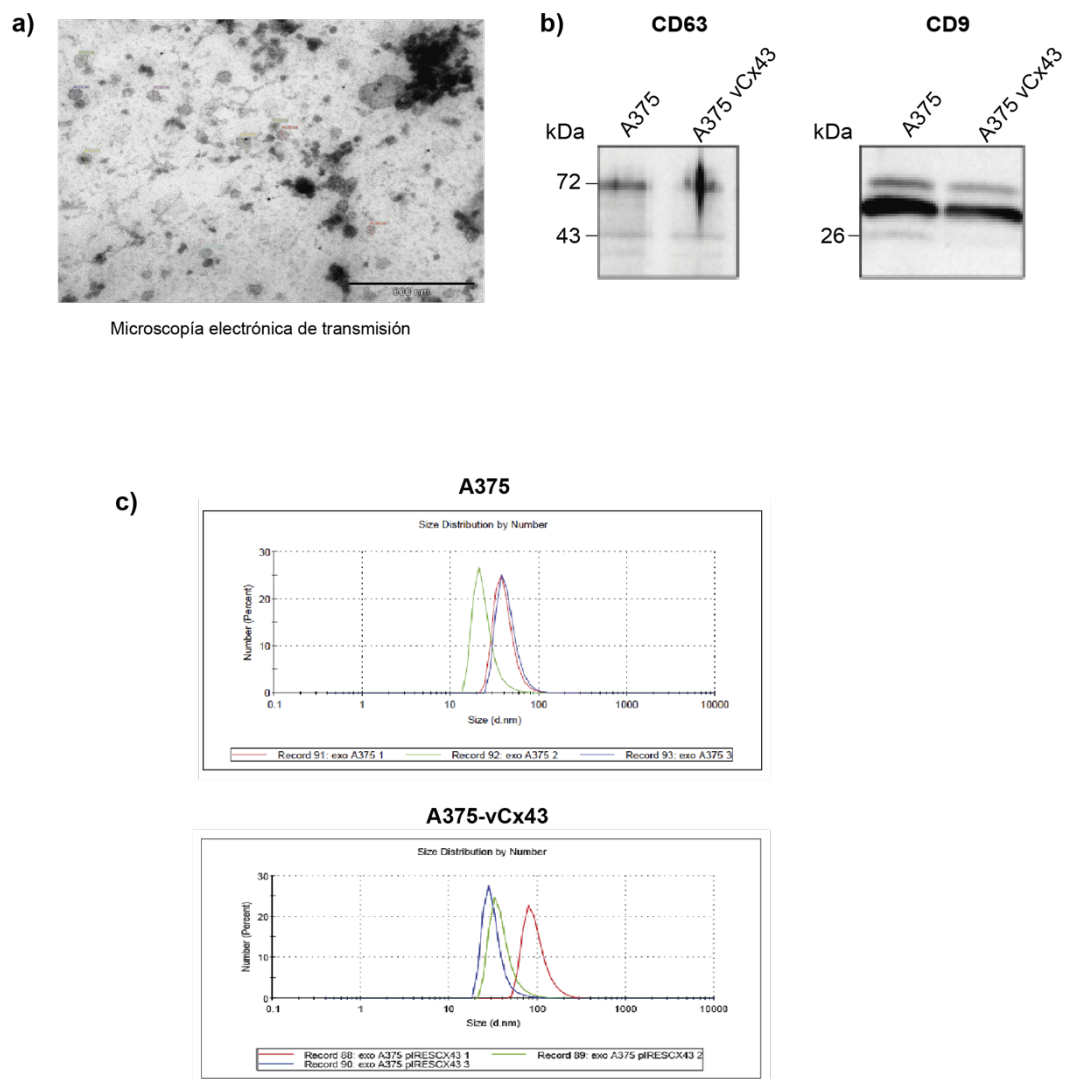


Figura 5. a) Imagen de microscopía electrónica de transmisión con tinción de partículas de plata para visualizar los exosomas. b) Análisis de diferentes marcadores de exosomas aislados de las líneas A375 y A375-vCx43 y analizados mediante Western-Blotting para detectar CD63 y CD9. c) Caracterización del tamaño de los exosomas mediante Zetasizer Nano Z.

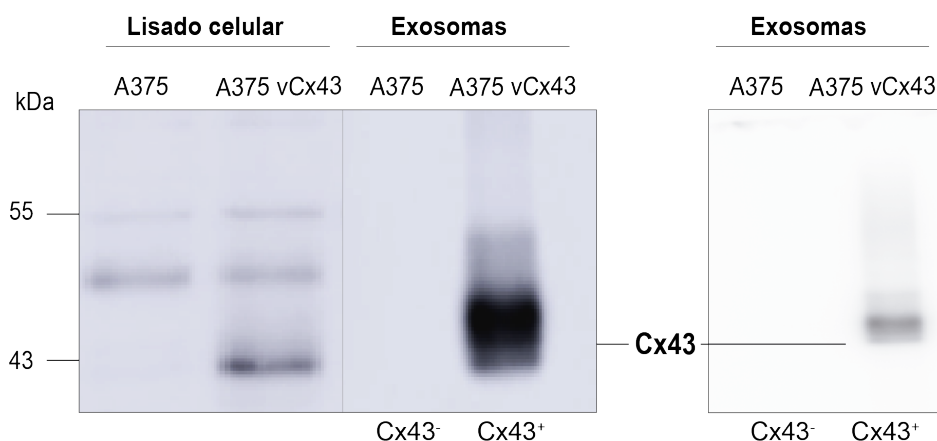


Figura 6. Presencia de Cx43 en lisados celulares de A375 y A375-vCx43 y en los exosomas de las mismas líneas detectada mediante WB.

4.3. Efecto de los exosomas positivos para Cx43 en las células de melanoma

Para observar el efecto que presenta la Cx43 de los exosomas en líneas de melanoma metastásico, diseñamos un experimento en el cual añadimos los exosomas positivos para la Cx43 procedentes de la línea A375-Cx43, a las células de la línea A375. A modo de control, la línea A375 también fue tratada con exosomas extraídos de la misma línea A375 negativos para la Cx43. Los exosomas fueron añadidos cada 48h durante una semana. Al cabo de una semana, se analizó mediante western blot la presencia de la Cx43 (**Figura 6**). Como se indica en la **Figura 7**, el tratamiento de la línea

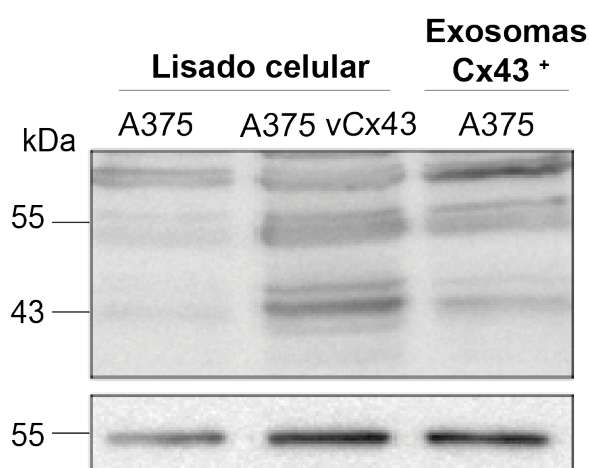


Figura 7. Niveles de Cx43 en las líneas A375, A375pCx43 (no tratadas) y en la A375 tratada con los exosomas positivos para Cx43 procedentes de la línea A385pCx43.

A375 con exosomas positivos para la Cx43 (previamente confirmado mediante western blot) da lugar a un incremento en los niveles de la Cx43 en la línea de melanoma original no transfectada. Mediante una RT-qPCR se comprobó que los exosomas positivos para Cx43 no sólo incrementaban la cantidad de proteína en las células receptoras, sino también se detectó un incremento en los niveles de ARNm de la Cx43, indicando un incremento de 4 veces en la expresión génica. (**Figura 8.a**).

Para estudiar el efecto de la Cx43 a nivel exosomal en crecimiento de células tumorales, se llevó a cabo un estudio de colonias (**Figura 8.b**). El tratamiento de la línea original A375 con exosomas positivos y negativos para Cx43 se llevó a cabo durante una semana, partiendo de un número inicial de 1000 células. Los resultados mostrados en la **Figura 8.b** demostraron que la Cx43 a nivel exosomal reduce la capacidad proliferativa y de formación de colonias, con respecto a las células tratadas con exosomas negativos para la Cx43.

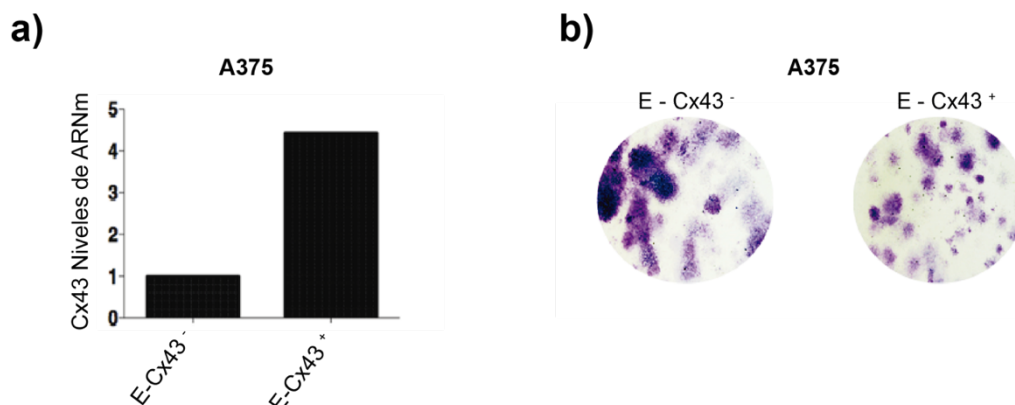


Figura 8. a) Niveles de ARNm de la Cx43 en exosomas de las A375 tratadas con exosomas procedentes de las A375 (Cx43-) y de las A375-vCx43 (Cx43+). b) Las imágenes representan los resultados de la capacidad de formación de colonias de las A375 tratadas con exosomas positivos y negativos para Cx43.

4.4. Caracterización del componente proteico en exosomas positivos y negativos para Cx43 aislados de células de melanoma.

La identificación de péptidos y proteínas en exosomas de las líneas de melanoma metastásico A375 y A375-vCx43, se realizó por espectrometría de masas. Los exosomas fueron aislados a partir de un cultivo de 20 millones de células, y fueron resuspendidos en tampón de lisis.

Posteriormente fueron enviados al servicio de la plataforma de proteómica del IDIS en Santiago de Compostela. En los análisis realizados se tuvieron en cuenta únicamente las proteínas con un FDR (tasa de falsos positivos) mayor de 0,65 para los exosomas positivos para Cx43, y un FDR superior a 0,71 para los exosomas negativos para Cx43. Se identificaron 1017 proteínas en los exosomas negativos para la Cx43 y 1460 proteínas en exosomas positivos para Cx43. Entre los análisis llevados a cabo, el diagrama de Venn mostrado en la **Figura 9** indica la presencia de 539 proteínas presentes únicamente en los exosomas positivos para Cx43. Por el contrario, sólo se encontraron 96 proteínas exclusivas de la línea A375. Ambos tipos de exosomas contienen 921 proteínas comunes.

Los primeros análisis de OG, utilizando los programas informáticos Panther y STRING, revelaron que las proteínas presentes en los exosomas de la línea que sobreexpresa la Cx43 se encuentran principalmente en el citoplasma, el núcleo, la membrana plasmática, en la región extracelular a modo de proteína soluble, y en los exosomas extracelulares (**Figura 10.a**). Las proteínas presentes en los exosomas negativos para Cx43 presentan un patrón de componentes celulares similar a exosomas con Cx43; sin embargo, las proteínas se encuentran en mayor proporción en la región

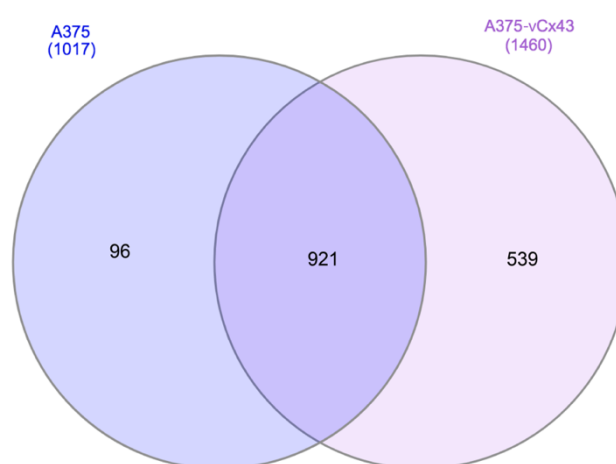


Figura 9. Diagrama de Venn con proteínas diferenciales y comunes en exosomas positivos y negativos para la Cx43.

extracelular, en los exosomas extracelulares, en la membrana y en el núcleo.

Con respecto a los procesos biológicos de exosomas con Cx43, (**Figura 10.a**) el análisis OG indicó la presencia de un importante número de proteínas relacionadas con la comunicación celular, respuesta a estímulos, expresión génica, procesos metabólicos de ácidos nucleicos y procesos metabólicos de proteínas. También es importante destacar que estas proteínas se encuentran implicadas en señales de transducción de la proteína RAS, ya que este proto-oncogen se activa en diversos tipos de cánceres y se encuentra en la cabeza de la cascada de señalización de la MAPK³⁰. Se detectaron proteínas implicadas en la regulación de procesos del sistema inmune y de la regulación positiva de la respuesta inmune innata. Según el componente proteico de los exosomas negativos para la Cx43 (**Figura 10.b**), estos se encuentran implicados en procesos de comunicación celular, expresión génica y procesos metabólicos de ácidos nucleicos y proteínas. Sin embargo, hay un menor número de proteínas implicadas en los procesos de respuesta a estímulos en comparación con los exosomas positivos para la Cx43. Otra diferencia presente entre las proteínas de ambos grupos de exosomas, es que los exosomas con Cx43 se encuentran implicados en la regulación de la actividad de los promotores de la ARN polimerasa I y II, mientras que no se identificaron proteínas relacionadas con esta actividad en los exosomas negativos para la Cx43.

El mismo análisis pero teniendo en cuenta sólo las proteínas presentes exclusivamente en los exosomas positivos para Cx43 (**Figura 11.a**), puso en evidencia que las proteínas exclusivas de estos exosomas se localizan principalmente en el citoplasma, el núcleo, la región extracelular y dentro del grupo de exosomas extracelulares. Sin embargo, las 96 proteínas exclusivas de los exosomas negativos para Cx43 (**Figura 11.b**) se encuentran en su mayor parte en la región extracelular y en vesículas de la membrana citoplasmática. Además, también se identificaron gran número de proteínas en los exosomas positivos para Cx43 que se encuentran en

las zonas de contacto célula-célula, en los melanosomas, en el complejo del proteasoma y en los exosomas extracelulares; mientras que ninguna de las proteínas de los exosomas negativos para Cx43 se encuentra en ninguna de esas localizaciones.

Con respecto a los procesos biológicos, en la **Figura 11** se puede observar que las proteínas exclusivas de los exosomas negativos para Cx43 únicamente se encontraron implicados en comunicación celular de entre todos los grupos que seleccionamos para la agrupación según procesos biológicos (**Figura 11.b**). Sin embargo, según el análisis llevado a cabo con el programa STRING, estos exosomas contienen proteínas implicadas en

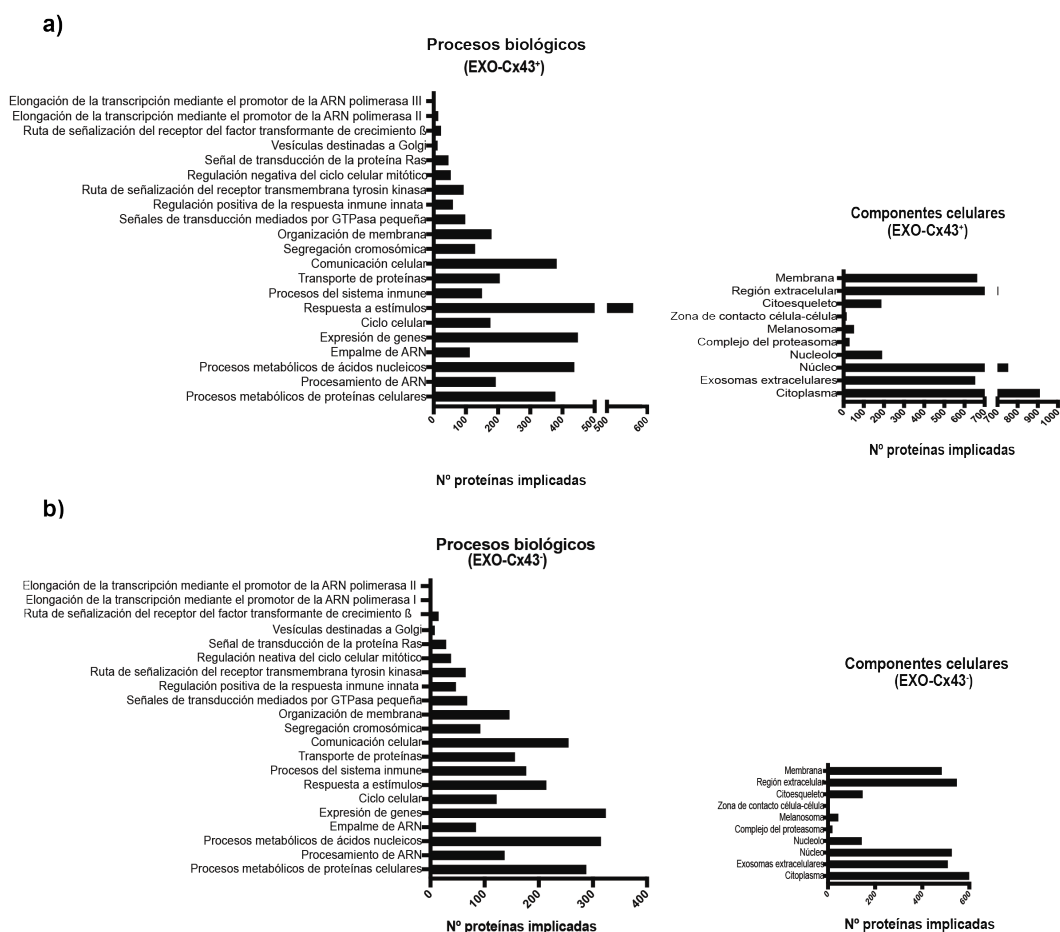
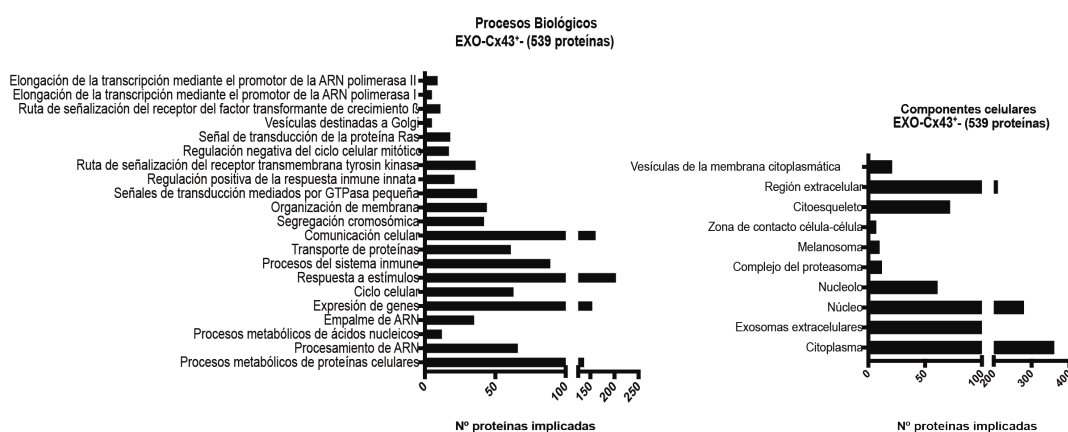


Figura 10. a) Clasificación de las proteínas de los exosomas negativos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular. b) Clasificación de las proteínas de los exosomas positivos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular.

procesos generales de desarrollo, organización de componentes celulares y biogénesis de componentes celulares. Por otro lado, las proteínas únicamente presentes en los exosomas positivos para Cx43 están implicadas en procesos de comunicación celular, de respuesta a estímulos, expresión génica, procesos metabólicos de proteínas, y procesos del sistema inmune principalmente. Cabe destacar su implicación en la elongación de la transcripción mediante el promotor de las polimerasas I y II, y la señal de transducción de la proteína RAS.

a)



b)

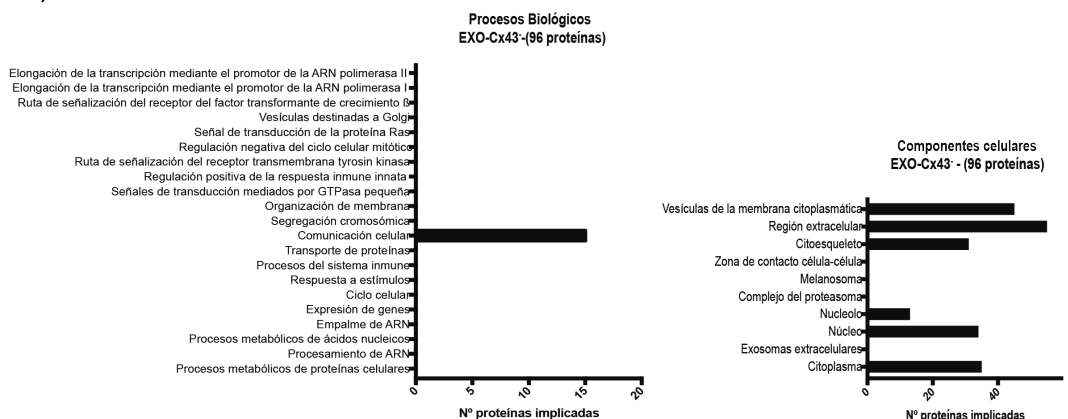


Figura 11. a) Clasificación de las proteínas exclusivas de los exosomas negativos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular. b) Clasificación de las proteínas exclusivas de los exosomas positivos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular.

Se ha realizado un mapa con las interacciones de las proteínas presentes en los exosomas negativos y positivos para la Cx43, así como de las proteínas diferenciales presentes en cada grupo. El mapa de interacciones de las proteínas totales en cada grupo generado a partir del programa STRING, tras el análisis de las proteínas presentes en los exosomas positivos y negativos para la Cx43 se muestra en la **Figura 12**. Entre las rutas de señalización, destacan varias proteínas presentes en los exosomas positivos para Cx43 relacionadas con el transporte de ARN, la ruta de señalización PI3K/AKT, endocitosis, proteoglicanos en cáncer, ruta de señalización Rap1 o ciclo celular entre otros. En la **Tabla suplementaria I** se muestran las 30 rutas con un mayor número de proteínas presentes en los exosomas positivos para Cx43 según el análisis llevado a cabo, utilizando el programa STRING.

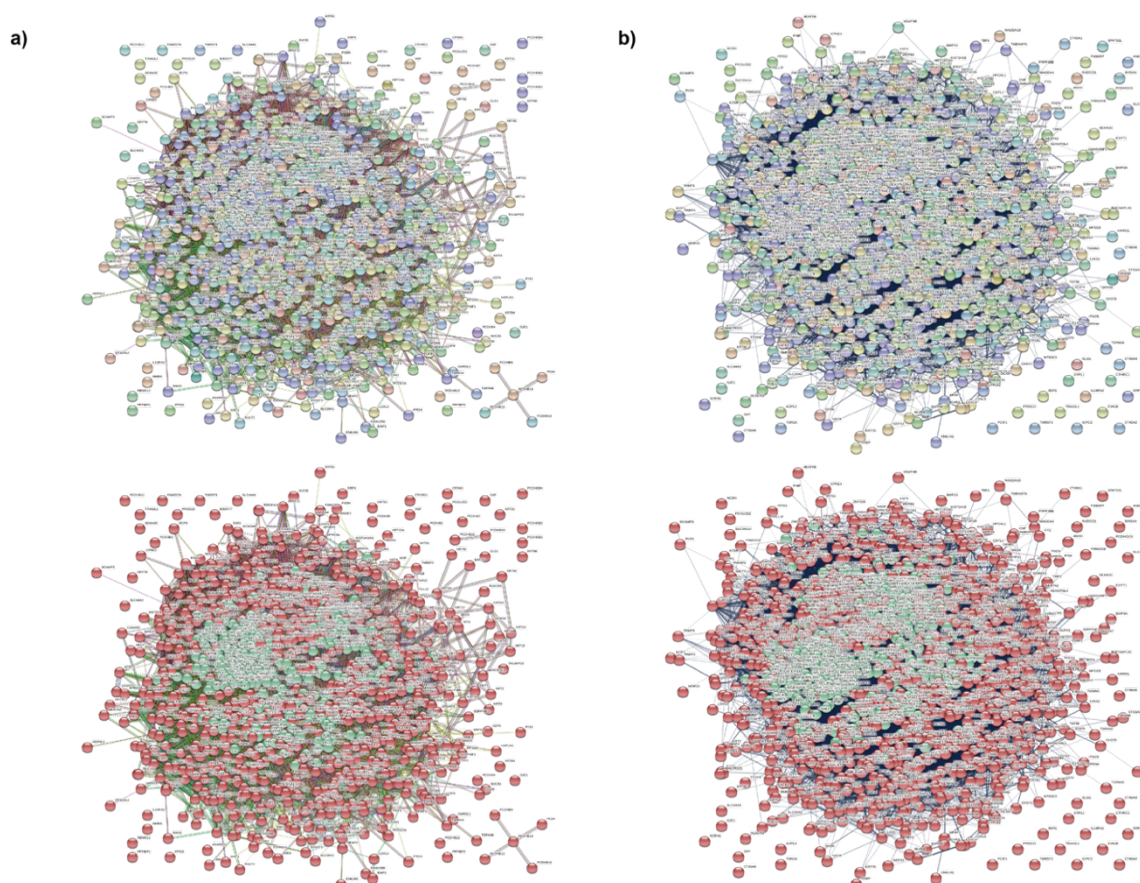


Figura 12. a) Mapa de interacciones entre las proteínas de los exosomas negativos para Cx43. Análisis cluster con k-medias, 2 clusters. b) Mapa de interacciones entre las proteínas de los exosomas positivos para Cx43. Análisis cluster con k-medias, 2 clusters

En los exosomas negativos para Cx43 destacan también distintas proteínas presentes en rutas implicadas en la vía de señalización PI3K/AKT, adhesión focal, transporte de ARN, rutas de cáncer, el complejo del proteasoma, vía de señalización Rap1 y uniones comunicantes. En la **Tabla suplementaria II** se muestran las 30 rutas con un mayor número de proteínas implicadas para los exosomas negativos para Cx43.

En un segundo análisis se crearon dos mapas para las proteínas específicas de los exosomas positivos y negativos para la Cx43. En la **Figura 13** se muestran ambos mapas, donde destacan grupos de proteínas de los exosomas positivos para Cx43 implicadas en rutas de transporte de ARN, adhesión focal, degradación del ARN o complejo del proteasoma. Entre las 96 proteínas presentes exclusivamente en los exosomas negativos para Cx43, solo se encontraron agrupadas en rutas implicadas, según la nomenclatura del análisis descargado, en la guía axonal. En esta ruta se encuentran implicadas dos proteínas tirosin quinasa (EPHB3 y EPHB4), las cuales están implicadas en la adquisición de resistencia a inhibidores BRAF. En este grupo también se encuentran implicadas cuatro GTPasas (RAC1, RAC2, RAC3 y SRGAP1) que presentan actividad tumorigénica. En la **Tabla suplementaria III** se muestran las rutas en las que se encuentran incluidas las proteínas diferenciales de los exosomas positivos y negativos para Cx43 según el análisis llevado a cabo, utilizando el programa STRING.

El análisis de la cantidad de proteínas comunes en los exosomas positivos y negativos para Cx43 permitió seleccionar las 30 proteínas que más difieren en el número peptídico entre ambas líneas **Tabla 4**. Por ejemplo, la proteína ACTG1 tiene 103 péptidos más en los exosomas negativos para la Cx43 que en los positivos. Esta proteína se encuentra implicada en la regulación positiva del ensamblaje de las uniones comunicantes, en la respuesta celular del interferón gamma, o en procesos de organización de la membrana. La proteína HSPA1A presenta 64 péptidos más en los

exosomas positivos para Cx43 que en los negativos, y está implicada en diversos procesos como la regulación negativa de la proliferación celular, o en la regulación positiva de la vía de señalización mediada por TNF- α (Factor de necrosis tumoral α). La proteína SERBP1 es mucho más abundante en exosomas positivos para Cx43, y está implicada en la regulación de procesos apoptóticos. La proteína NME1 es 10 veces más abundante en los exosomas positivos para Cx43, y está implicada en la regulación negativa de la proliferación celular y expresión génica, así como en la regulación positiva de la proliferación de células epiteliales, o en la regulación de procesos apoptóticos.

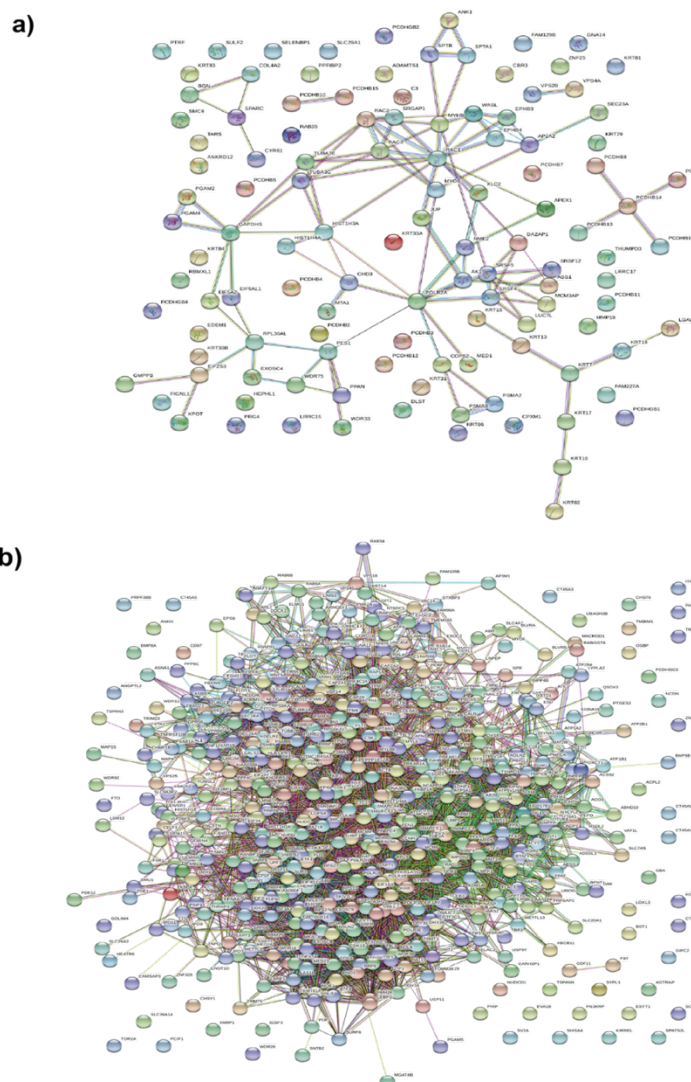


Figura 13. a) Mapa de interacciones entre las proteínas exclusivas de los exosomas negativos para Cx43. b) Mapa de interacciones entre las proteínas exclusivas de los exosomas positivos para Cx43.

Tabla 4. Rutas en las que se encuentran implicadas proteínas presentes en los exosomas positivos para Cx43 y en los negativos. Se presenta el número de péptidos implicados en cada ruta y la diferencia de expresión proteica que se da entre ambas líneas.

A375	Péptidos(95%)	A375-vCx43	Péptidos(95%)	Diferencia de péptidos
ACTG1	104	ACTG1	1	103
HSPA1A	28	HSPA1A	92	64
SERBP1	1	SERBP1	63	62
CLTC	183	CLTC	239	56
GAPDH	30	GAPDH	86	56
RPL4	73	RPL4	25	48
RPL21	2	RPL21	43	41
AP1B1	2	AP1B1	41	39
ITGA6	39	ITGA6	1	38
HSPB1	41	HSPB1	6	35
CD109	20	CD109	51	31
TUBB3	9	TUBB3	37	28
MTHFD1	11	MTHFD1	38	27
PPP2R5E	28	PPP2R5E	2	26
EPRS	17	EPRS	42	25
EIF3E	3	EIF3E	27	24
PCOLCE	15	PCOLCE	39	24
EEF1A1	13	EEF1A1	36	23
HSP90AB1	42	HSP90AB1	65	23
EZR	3	EZR	25	22
LDHB	36	LDHB	15	21
RPS9	11	RPS9	32	21
APRT	5	APRT	24	19
PRKDC	24	PRKDC	43	19
VARs	16	VARs	35	19
CDC37	19	CDC37	1	18
LDHA	3	LDHA	21	18
NME1	2	NME1	20	18
STOM	7	STOM	25	18
RPL13	24	RPL13	7	17

5. Discusión

La Cx43 es un potente factor supresor de tumores en melanoma^{13,14}. Sin embargo, su función en la progresión del melanoma maligno como en procesos de intravasación/extravasación y en resistencia a tratamientos todavía se encuentra en estudio. Estudios recientes han demostrado que la presencia de la Cx43 en los exosomas favorece la internalización de estas vesículas por las células receptoras aportando una nueva vía de comunicación entre el exosoma y la célula sin necesidad de internalización²⁵.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto que ejerce la Cx43 a nivel exosomal en una línea de melanoma humano metastásico. Para llevar a cabo este objetivo se transfectó mediante electroporación la línea A375 con un vector para expresar de Cx43. El incremento en los niveles de Cx43 desencadenó en la detección de esta proteína transmembrana en las vesículas extracelulares y exosomas. El aumento de los niveles de la Cx43 restauró la localización en la membrana celular, restaurando la comunicación intercelular a través de UCs. Posteriormente exosomas aislados de la línea A375 negativos para la Cx43 y de la misma línea pero transfectada (exosomas positivos para la Cx43) fueron utilizados para tratar la línea original de melanoma. En el análisis previo mediante western blot reveló que la Cx43 en exosomas se encuentra fundamentalmente en su forma nativa, y con bandas superiores que se corresponderían con formas fosforiladas de la Cx43²⁵. El tratamiento durante 1 semana de la línea metastásica original con exosomas positivos para la Cx43 en su forma nativa, es capaz de disminuir la proliferación celular y la capacidad formadora de colonias de esta línea celular. Estos resultados indican que la presencia de la Cx43 en la partícula exosomal podría dotar a la misma de una capacidad supresora de metástasis.

Mediante espectrometría de masas hemos analizado el componente proteico de los exosomas positivos y negativos para la Cx43, detectándose

considerables diferencias entre ambos grupos de exosomas. Al comprobar el número de proteínas específicas para cada grupo, se ha visto que los exosomas positivos para la Cx43 presentan un número mayor de proteínas diferenciales respecto a exosomas negativos para la Cx43. La presencia de la Cx43 cambia el patrón de los procesos biológicos en los que la partícula exosomal podría estar implicada. Por ejemplo, los exosomas aislados de la línea que sobreexpresa Cx43 tienen 3 veces más proteínas implicadas en la respuesta a estímulos. Además, los exosomas positivos para Cx43 se encuentran implicados en la elongación de la transcripción mediada por el promotor de la ARN polimerasa I y II. Sin embargo ninguna proteína de los exosomas negativos para Cx43 está implicada en esta ruta. También hemos observado en ambos tipos de exosomas la presencia de proteínas implicados en la señal de transducción de la proteína RAS. La vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK es una de las vías oncogénicas clave que impulsa la progresión del melanoma BRAF mutado y también se sabe que desempeña un papel central en la diferenciación y expansión normal de los melanocitos³¹. Por otro lado, las proteínas exclusivas de los exosomas negativos para Cx43 presentan una localización celular más limitada, no encontrándose en las zonas de contacto célula-célula, en los melanosomas, el complejo del proteasoma o los exosomas extracelulares.

Cuando analizamos los procesos biológicos de las proteínas de los exosomas positivos para Cx43, se detectó que un grupo de proteínas están implicadas en rutas que regulan procesos de cáncer y en la ruta de señalización PI3K-AKT. La ruta PI3K-AKT es de especial interés, puesto que existen evidencias de que juega un papel importante en la resistencia a inhibidores BRAF/MEK³². También es importante su implicación en la vía de señalización de Rap1. Rap1 es un regulador central de la adhesión celular y la motilidad, y se encarga de regular múltiples pasos en la cascada metastásica³³.

Es importante destacar que hemos observado varias proteínas exclusivas de los exosomas positivos para Cx43 implicadas en la replicación del ADN, como son las helicasas MCM4, MCM6 y MCM7. En el caso de la MCM7 por ejemplo, además de participar en el inicio de la replicación del ADN, esta proteína también se ha visto implicada en la activación del punto de control de la fase S por daño inducido por UV³⁴.

Al comparar las proteínas comunes entre los exosomas positivos y negativos para la Cx43, hemos observado que existe una diferencia de expresión (abundancia) de las mismas medida por el número de péptidos que presenta cada una. Tras analizar estos datos, hemos observado que los exosomas negativos para la Cx43 presentan un mayor número de péptidos de proteínas implicadas en la regulación del interferón gamma (IFN- γ), como la proteína ACTG1. También hemos visto que los exosomas positivos para la Cx43, presentan mayor abundancia de proteínas implicadas en la regulación negativa de la proliferación celular, como HSPA1A o NME1.

Los resultados de este trabajo de fin de máster, indican que la Cx43 actúa a modo de andamiaje a nivel exosomal reclutando proteínas implicadas en diversas rutas de señalización. Estos resultados indican que la Cx43 podría cambiar la función del exosoma repercutiendo negativamente en el progreso del tumor. Nuestro próximo objetivo es caracterizar con más detalle el componente proteico y diseñar estudios funcionales para poder corroborar la actividad global del componente proteico y de la Cx43 a nivel exosomal en metástasis, utilizando modelos animales (xenotransplante). Para completar el estudio identificaremos mediante ARN-seq las moléculas de ARN presentes en exosomas liberados con y sin Cx43, ya que la Cx43 también presenta potenciales dominios de unión a moléculas de ARN y ADN. Estos resultados nos ayudarían a entender el efecto y función de la Cx43 a nivel exosomal con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan reactivar y mantener la función de la Cx43 en

melanoma metastásico y durante el proceso de resistencia a los tratamientos convencionales, especialmente en los casos de melanoma BRAF mutado

6. Conclusiones

Conclusiones relacionadas con el objetivo 1:

- La expresión ectópica de Cx43 en melanoma metastásico restaura la función de la Cx43 en membrana y la comunicación intercelular a través de UCs.
- El aumento de la expresión de la Cx43 en melanoma es suficiente para favorecer la Cx43 a nivel exosomal.

Conclusiones relacionadas con el objetivo 2:

- La Cx43 a nivel exosomal se encuentra mayoritariamente en la forma no modificada (forma nativa de la proteína) y fosforilada, no detectándose bandas de mayor peso molecular correspondientes a SUMOilación o ubiquitinación de la proteína.
- La presencia de la Cx43 en la partícula exosomal cambia la función de la vesícula dotándola de capacidad supresora de formación de colonias.
- La Cx43 participa en el anclaje o reclutamiento de proteínas a nivel exosomal. La presencia de la Cx43 en el exosoma cambia el componente proteico afectando, por ejemplo, a la regulación de la transcripción por ARN-Pol I y Pol II, a la replicación del ADN o al metabolismo celular.

7. Apéndices

7.1. Índice de figuras

Figura 1. Canales formados por diversos tipos de conexones y UCs .Imagen obtenida y adaptada de Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. Cell. 1996;84(3):381-8.	12
Figura 2. Patrón de expresión de las Cxs en la epidermis. La Cx43 se expresa en todas las capas de la epidermis. Imagen obtenida y adaptada de Martin PE, Easton JA, Hodgins MB, Wright CS. Connexins: sensors of epidermal integrity that are therapeutic targets. FEBS Lett. 2014;588(8):1304-14.	13
Figura 3. Sobreexpresión de Cx43 en la línea de melanoma metastásico A375 mediante el vector pIRES puro 2. a) Expresión de Cx43 a nivel de ARNm en las líneas A375 y A375pCx43. Patrón de expresión de la Cx43 por Western-Blot de A375, A375 pCont y A375pCx43. Se utilizó la tubulina como control de carga. b) Localización celular de la Cx43 por inmunofluorescencia, con las líneas A375 y A375pCx43.	27
Figura 4. Medida de la transferencia de LY mediante Scrape Loading con las líneas A375 y A375-vCx43 para estudiar la actividad de las UCs.	28
Figura 5. a) Imagen de microscopía electrónica de transmisión con tinción de partículas de plata para visualizar los exosomas. b) Análisis de diferentes marcadores de exosomas aislados de las líneas A375 y A375-vCx43 y analizados mediante Western-Blotting para detectar CD63 y CD9. c) Caracterización del tamaño de los exosomas mediante Zetasizer Nano Z.	30
Figura 6. Presencia de Cx43 en lisados celulares de A375 y A375-vCx43 y en los exosomas de las mismas líneas detectada mediante WB.	31
Figura 7. Niveles de Cx43 en las líneas A375, A375pCx43 (no tratadas) y en la A375 tratada con los exosomas positivos para Cx43 procedentes de la línea A385pCx43.	31
Figura 8. a) Niveles de ARNm de la Cx43 en exosomas de las A375 tratadas con exosomas procedentes de las A375 (Cx43-) y de las A375-vCx43 (Cx43+). b) Las imágenes representan los resultados de la capacidad de formación de colonias de las A375 tratadas con exosomas positivos y negativos para Cx43.	32
Figura 9. Diagrama de Venn con proteínas diferenciales y comunes en exosomas positivos y negativos para la Cx43.	33

Figura 10. a) Clasificación de las proteínas de los exosomas negativos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular. b) Clasificación de las proteínas de los exosomas positivos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular.	35
Figura 11. a) Clasificación de las proteínas exclusivas de los exosomas negativos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular. b) Clasificación de las proteínas exclusivas de los exosomas positivos para Cx43 identificadas según OG con respecto a los procesos biológicos en los que están implicadas y su localización celular.	36
Figura 12. a) Mapa de interacciones entre las proteínas de los exosomas negativos para Cx43. Análisis cluster con k-medias, 2 clusters. b) Mapa de interacciones entre las proteínas de los exosomas positivos para Cx43. Análisis cluster con k-medias, 2 clusters.....	37
Figura 13. a) Mapa de interacciones entre las proteínas exclusivas de los exosomas negativos para Cx43. b) Mapa de interacciones entre las proteínas exclusivas de los exosomas positivos para Cx43.	39

7.2. Índice de tablas

Tabla 1. Reactivos gel plata. Volumen final de 50 mL.	20
Tabla 2. Composición de dos geles de poliacrilamida y de los tampones utilizados para la detección de proteínas en membranas de nitrocelulosa. SDS (dodecilsulfato sódico), PSA (persulfato amónico).	22
Tabla 3. Cebadores sentido y antisentido utilizados para el análisis de la expresión de Cx43 (GJIA1) y HPTR (HPRT1) mediante RT-PCR.	24
Tabla 4. Rutas en las que se encuentran implicadas proteínas presentes en los exosomas positivos para Cx43 y en los negativos. Se presenta el número de péptidos implicados en cada ruta y la diferencia de expresión proteica que se da entre ambas líneas.	40

8. Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de este trabajo, llevado a cabo en el grupo CellCOM y dirigido por la Dra. María Mayán y el Dr. Eduardo Fonseca.

Gracias a la Dra. Mayán por acogerme en su grupo de investigación como a una más de la familia que ya formamos. Gracias por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo y muchos (muchos) otros. Por su infinita paciencia y por ser el ejemplo de investigadora que algún día me gustaría llegar a ser.

A Adrián Varela y Marta Varela (no, no son hermanos) decirles que si estoy hoy aquí es gracias a ellos. Este trabajo no podría haberse llevado a cabo sin todas sus enseñanzas, consejos y sin su infinito apoyo. Mentores y grandes amigos, gracias por enseñarme a amar la ciencia a pesar de los obstáculos.

Gracias a “los del labo” por cada día sacarme una sonrisa y hacer que los momentos difíciles lo fueran un poco menos.

Agradecer a todo el personal del INIBIC que, de una forma u otra, siempre ha estado dispuesto a echar una mano, a resolver dudas y a hacer los días más amenos.

Mil gracias a Eva Blanco, porque sin ella nunca habría empezado esta aventura.

Por último, mencionar a Iago, a mi hermano y a mis padres. Pilares fundamentales en mi vida y fuente de apoyo inagotable. Todo lo que soy os lo debo a vosotros.

GRACIAS.

9. Bibliografía

1. Nielsen MS, et al. NH. Gap junctions. *Compr Physiol*. 2012;2(3):1981-2035.
2. Nelson CM, et al. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:287-309.
3. Panchin Y, et al. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol*. 2000;10(13):R473-4.
4. Phelan P, et al. Drosophila Shaking-B protein forms gap junctions in paired *Xenopus* oocytes. *Nature*. 1998;391(6663):181-4.
5. Ribeiro-Rodrigues TM, et al. Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication - gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *J Cell Sci*. 2017;130(21):3619-30.
6. Brose MS, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*. 2002;62(23):6997-7000.
7. Leybaert L, et al. Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease: Pharmacological Implications. *Pharmacol Rev*. 2017;69(4):396-478.
8. Kumar NM, et al. The gap junction communication channel. *Cell*. 1996;84(3):381-8.]
9. Gago-Fuentes R, et al. Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(4):586-90.
10. Mese G, et al. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 2007;127(11):2516-24. Principio del formulario
11. Martin PE, et al. Connexins and skin disease: insights into the role of beta connexins in skin homeostasis. *Cell Tissue Res*. 2015;360(3):645-58.

12. Tarzeman R, et al. Expression and function of connexin 43 in human gingival wound healing and fibroblasts. *PLoS One*. 2015;10(1):e0115524.
13. Tittarelli A, et al. Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. *Br J Cancer*. 2015;113(2):259-67.
14. Ableser MJ, et al. Connexin43 reduces melanoma growth within a keratinocyte microenvironment and during tumorigenesis in vivo. *J Biol Chem*. 2014;289(3):1592-603.
15. Martínez Jáñez N. SEOM 2017 [Available from: <https://www.seom.org/>.
16. Miller AJ, et al. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355(1):51-65.
17. Naus CC, et al. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):435-41.
18. Omholt K, et al. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6483-8.
19. Millington GW. Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies et al. (*Nature* 2002; 417: 949-54). *Clin Exp Dermatol*. 2013;38(2):222-3.
20. Park JI. Growth arrest signaling of the Raf/MEK/ERK pathway in cancer. *Front Biol (Beijing)*. 2014;9(2):95-103.
21. Aasen T, et al. Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(12):775-88. Johnstone SR, Kroncke BM, Straub AC, Best AK, Dunn CA, Mitchell LA, et al. MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*. 2012;111(2):201-11.
22. Peinado H, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012;18(6):883-91.
23. Rodriguez-Boulán E, et al. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(3):233-47.

24. Hannafon BN, et al. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):14240-69.
25. Martins-Marques T, et al. Presence of Cx43 in extracellular vesicles reduces the cardiotoxicity of the anti-tumour therapeutic approach with doxorubicin. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:32538.
26. Smith RA, et al. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. *CA Cancer J Clin.* 2003;53(1):27-43.
27. Nelson JD, et al. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc.* 2006;1(1):179-85
28. Malla RR, et al. Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018.
29. Marquez-Rosado L, et al. Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):1985-92.
30. Kwong LN, et al. Oncogenic NRAS signaling differentially regulates survival and proliferation in melanoma. *Nat Med.* 2012;18(10):1503-10.
31. Li Y, et al. Activation of mutant TERT promoter by RAS-ERK signaling is a key step in malignant progression of BRAF-mutant human melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(50):14402-7.
32. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J.* 2012;18(2):142-7.
33. Freeman SA, et al. Preventing the activation or cycling of the Rap1 GTPase alters adhesion and cytoskeletal dynamics and blocks metastatic melanoma cell extravasation into the lungs. *Cancer Res.* 2010;70(11):4590-601.
34. Ishimi Y. A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24508

Tabla suplementaria 1. Proteínas presentes en los exosomas positivos para Cx43.

Rutas descritas	Número de proteínas	p-valor<0.05	Proteínas implicadas. Se indica el nombre del gen
Metabolic pathways	134	1.00E-08	ACADVL,ACAT1,ACLY,ACOI1,ACSS2,ADH5,ADK,ADSS,ADSSL1,AHCY,AHCYL1,AHCYL2,AK2,AKR1A1,ALDH1A3,ALDH7A1,ALDH9A1,ALDOA,ANPEP,APRT,ATIC,ATP5A1,ATP5B,ATP6V1A,ATP6V1B2,ATP6V1H,B3GAT3,BDH2,BPNT1,BST1,CAD,CHSY1,CMAS,CMPK1,CNDP2,CS,CTPS1,CTPS2,DAK,DCXR,EPRS,FASN,FLAD1,G6PD,GALE,GALNT2,GANAB,GAPDH,GART,GBA,GFPT1,GMDS,GMPPA,GMP,S,GNE,GOT1,GOT2,GPI,GRHR,GSS, HSD17B10,IDH1,IDH3A,IMPAD1,IMPDH2,INPP4B,ISYNA1,ITPA,LAP3,LDHB,MAT2A,MAT2B,MDH1,MDH2,MGAT4B,MPST,MRI1,MTHFD1,NANS,NME1,NT5E,OAT,PAFAH1B1,PAICS,PAPSS1,PAPSS2,PDHA1,PDHK,PFAAS,PFKL,PFKP,PGAM1,PGD,PGK1,PGLS,PGM1,PGM2,PHGDH,PIK3C2A,PKM,POLR1A,POLR1B,POLR1C,POLR2B,POLR2E,POLR2H,POLR3A,POLR3B,PPAT,PRDX6,PRPS1L1,PRPS2,PTGES2,PTGES3,PYGB,QARS,QDPR,RRM1,SDHA,SHMT1,SHMT2,SMS,SPR,SRM,ST3GAL4,TALDO1,TKT,TPI1,TSTA3,UAP1,UGDH,UMPS,UROD,UXS1
Ribosome	70	2.79e-45	FAU,RPL10,RPL10A,RPL11,RPL12,RPL13,RPL13A,RPL14,RPL15,RPL17,RPL18,RPL18A,RPL19,RPL21,RPL22,RPL23,RPL23A,RPL24,RPL26L1,RPL27,RPL27A,RPL28,RPL29,RPL3,RPL30,RPL31,RPL32,RPL34,RPL35,RPL35A,RPL36,RPL36A,RPL37A,RPL4,RPL5,RPL6,RPL7,RPL7A,RPL8,RPL9,RPLP0,RPLP1,RPLP2,RPS10,RPS11,RPS13,RPS14,RPS15,RPS15A,RPS16,RPS18,RPS19,RPS2,RPS20,RPS23,RPS24,RPS25,RPS26,RPS27,RPS27A,RPS27L,RPS3,RPS3A,RPS4X,RPS5,RPS6,RPS7,RPS8,RPS9,UBA52
Spliceosome	63	2.55e-38	ACIN1,CHERP,DDX23,DDX39B,DDX46,DDX5,DHX15,DHX16,DHX38,DHX8,EFTUD2,EIF4A3,HNRNP43,HNRNPC,HNRNPK,HNRNPM,HNRNPU,HSPA1A,HSPA8,NCBP1,NHP2L1,PCBP1,PRPF19,PRPF3,PRPF31,PRPF38B,PRPF4,PRPF40A,PRPF6,PRPF8,PUF60,RBM25,RBM8A,RBMX,SF3A1,SF3A3,SF3B1,SF3B2,SF3B3,SF3B4,SNRNP200,SNRNP40,SNRNP70,SNRPA,SNRPA1,SNRPB,SNRPB2,SNRPD1,SNRPD2,SNRPD3,SNRPE,SRSF1,SRSF10,SRSF2,SRSF3,SRSF6,SRSF7,SRSF9,TRA2A,TRA2B,U2AF2,U2SURP,USP39
Epstein-Barr virus infection	49	5.92e-15	CD44,EIF2AK2,GSK3B,HDAC1,HDAC2,HLA-A,HLA-B,HLA-C,HLA-DPB1,HLA-DRA,HLA-DRB1,HSPA1A,HSPA8,HSPB1,ICAM1,NEDD4,POLR1C,POLR2B,POLR2E,POLR2H,POLR3A,POLR3B,POLR3E,PSMC1,PSMC3,PSMC4,PSMC5,PSMC6,PSMD1,PSMD11,PSMD12,PSMD13,P

RNA transport	46	8.65e-17	SMD14,PSMD2,PSMD3,PSMD4,PSMD6,PSMD7,PSMD8,RAN,SND1,USP7,VIM,XPO1,YWHAB,YWHAЕ,YWHAG,YWHAQ,YWHAZ
Regulation of actin cytoskeleton	44	1.99e-10	ACIN1,DDX20,DDX39B,EEF1A1,EEF1A2,EIF1AX,EIF2B4,EIF2S1,EIF2S2,EIF3A,EIF3B,EIF3C,EIF3CL,EIF3D,EIF3E,EIF3F,EIF3H,EIF3I,EIF4A3,EIF4E,EIF4E1B,EIF4G1,EIF5,EIF5B,ELAC2,FXR1,GEMIN4,GEMIN5,KPNB1,NCBP1,NUP62,PABPC1,PABPC4,POP1,PRMT5,RAE1,RAN,RBM8A,RNPS1,SAP18,SEC13,SRRM1,STRAP,UPEF1,XPO1,XPO5
Viral carcinogenesis	43	7.35e-12	ACTB,ACTG1,ACTN1,ACTN4,ARHGEF1,ARPC1B,ARPC2,ARPC3,CDC42,CFL1,DIAPH1,DOCK1,EZR,GIT1,GNA13,GNG12,GSN,HRAS,IQGAP1,ITGA2,ITGA3,ITGA4,ITGA6,ITGA9,ITGAV,ITGB1,ITGB5,MAP2K1,MSN,MYH10,MYL12A,MYL12B,NCKAP1,NRAS,PFN1,PFN2,PPP1CA,PPP1CB,PPP1CC,PPP1R12A,RDX,RHOA,SRC,VCL
Alcoholism	42	1.42e-15	ACTN1,ACTN4,CDC42,CDK6,CHD4,DDB1,DDX3X,EIF2AK2,GSN,HDAC1,HDAC2,HIST1H2BB,HIST1H2BD,HIST1H2BH,HIST1H2BJ,HIST1H2BK,HIST1H2BL,HIST1H2BM,HIST1H2BN,HIST1H2BO,HIST2H2BE,HIST2H2BF,HIST3H2BB,HLA-A,HLA-B,HLA-C,HNRNPК,HRAS,NRAS,PKM,PSMC1,RANBP1,RHOA,SND1,SRC,UBR4,USP7,VAC14,YWHAB,YWHAЕ,YWHAG,YWHAQ,YWHAZ
PI3K-Akt signaling pathway	42	0.000643	CALM1,GNAI2,GNAI3,GNAS,GNB2,GNG12,H2AFJ,H2AFV,H2AFX,H2AFY,H2AFZ,H3F3A,HAT1,HDAC1,HDAC2,HIST1H2AA,HIST1H2AD,HIST1H2AH,HIST1H2AJ,HIST1H2BB,HIST1H2BD,HIST1H2BH,HIST1H2BJ,HIST1H2BK,HIST1H2BL,HIST1H2BM,HIST1H2BN,HIST1H2BO,HIST2H2AA,HIST2H2AB,HIST2H2AC,HIST2H2BE,HIST2H2BF,HIST2H3A,HIST3H2BB,HIST3H3,HRAS,MAP2K1,NRAS,PPP1CA,PPP1CB,PPP1CC
Focal adhesion	41	3.23e-09	CDC37,CDK6,COL6A1,EIF4E,EIF4E1B,EPHA2,FLT1,GNB2,GNG12,GSK3B,GYS1,HRAS,HSP90AA1,HSP90AB1,HSP90B1,ITGA2,ITGA3,ITGA4,ITGA6,ITGA9,ITGAV,ITGB1,ITGB5,LAMA5,LAMB1,LAMC1,MAP2K1,NRAS,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R2A,PPP2R5E,RPS6,THBS1,THBS3,TNC,YWHAB,YWHAЕ,YWHAG,YWHAQ,YWHAZ
Endocytosis	40	2.48e-09	ACTB,ACTG1,ACTN1,ACTN4,CAPN2,CDC42,COL6A1,CTNNB1,DIAPH1,DOCK1,FLNA,FLT1,GSK3B,HRAS,ITGA2,ITGA3,ITGA4,ITGA6,ITGA9,ITGAV,ITGB1,ITGB5,LAMA5,LAMB1,LAMC1,MAP2K1,MYL12A,MYL12B,PPP1CA,PPP1CB,PPP1CC,PPP1R12A,RAP1A,RAP1B,RHOA,SRC,THBS1,THBS3,TLN1,TNC,VCL
Phagosome	37	1.43e-11	AP2A1,AP2B1,ARF6,CDC42,CHMP1B,CHMP2A,CHMP4B,CLTA,CLTC,DNM1,DNM2,EHD1,EHD4,FAM125A,FLT1,GIT1,HLA-A,HLA-B,HLA-C,HRAS,HSPA1A,HSPA8,ITCH,LDLR,NEDD4,NEDD4L,PDCD6IP,RAB11B,RAB5A,RAB7A,RHOA,SRC,TFRC,TSGL1,TPS25,TPS37B,TPS37C,TPS45,TPS4B,VTG1

Systemic lupus erythematosus	36	8.65e-17	DRB1,ITGA2,ITGAV,ITGB1,ITGB5,LAMP1,LAMP2,M6PR,RAB5A,RAB7A,TERC,THBS1,THBS3,TUBA1A,TUBA1B,TUBA4A,TUBB,TUBB2A,TUBB2B,TUBB3,TUBB4A,TUBB4B,TUBB6
Carbon metabolism	34	6.68e-14	ACTN1,ACTN4,H2AFJ,H2AFV,H2AFY,H2AFZ,H3F3A,HIST1H2AA,HIST1H2AD,HIST1H2AH,HIST1H2AJ,HIST1H2BB,HIST1H2BD,HIST1H2BH,HIST1H2BJ,HIST1H2BK,HIST1H2BL,HIST1H2BM,HIST1H2BN,HIST1H2BO,HIST2H2AA3,HIST2H2AB,HIST2H2AC,HIST2H2BE,HIST2H2BF,HIST2H3A,HIST3H2BB,HIST3H3,HLA-DPB1,HLA-DRA,HLA-DRB1,SNRPB,SNRPD1,SNRPD3,SSB
Protein processing in endoplasmic reticulum	33	1.38e-07	ACAT1,ACO1,ACSS2,ADH5,ALDOA,CS,DAK,ESD,G6PD,GAPDH,GOT1,GOT2,GPI,IDH1,IDH3A,MDH1,MDH2,PDHA1,PFKL,PFKP,PGAM1,PGD,PGK1,PGLS,PHGDH,PKM,PRPS1L1,PRPS2,SDHA,SHMT1,SHMT2,TALDO1,TKT,TPI1
Proteoglycans in cancer	33	9.91e-05	CALR,CAPN1,CAPN2,DNAJA1,DNAJA2,DNAJB1,EIF2AK2,EIF2S1,GANAB,HSP90AA1,HSP90AB1,HSP90B1,HSPA1A,HSPA5,HSPA8,HSPH1,HYOU1,MBTPS1,P4HB,PDIA3,PDIA6,PLAA,RAD23B,RRBP1,SAR1A,SAR1B,SEC13,SEC23B,SEC31A,SKP1,STUB1,UBE4B,VCP
Purine metabolism	32	5.09e-07	ACTB,ACTG1,ARHGEF1,CD44,CD63,CD642,CTNNB1,DDX5,EZR,FLNA,HRAS,IQGAP1,ITGA2,ITGAV,ITGB1,ITGB5,MAP2K1,MMP2,MSN,NRAS,PDCD4,PLAUR,PPP1CA,PPP1CB,PPP1CC,PP1R12A,RDX,RHOA,RPS6,SRC,THBS1,TIMP3,WNT5A
mRNA surveillance pathway	30	6.66e-13	ADK,ADSS,ADSSL1,AK2,APRT,AT1C,GART,GMPs,IMPDH2,ITPA,NME1,NT5E,PAICS,PAPSS1,PAPSS2,PFAS,PGM1,PGM2,PKM,POLR1A,POLR1B,POLR1C,POLR2B,POLR2E,POLR2H,POLR3A,POLR3B,POLR3E,PPAT,PRPS1L1,PRPS2,RRM1
Proteasome	27	2.00E-19	ACIN1,CPSF1,CPSF2,CPSF6,CPSF7,DDX39B,EIF4A3,ETF1,GSPT1,MSI2,NCBP1,NUDT21,PABPC1,PABPC4,PPP1CA,PPP1CB,PPP1CC,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R2A,PPP2R5E,RB M8A,RNMT,RNPS1,SAP18,SRRM1,SYMPK,UPF1,WDR82
Ribosome biogenesis in eukaryotes	26	1.43e-11	PSMA3,PSMA5,PSMA6,PSMA7,PSMB2,PSMB3,PSMB5,PSMB6,PSMC1,PSMC3,PSMC4,PSMC5,PSMC6,PSMD1,PSMD11,PSMD12,PSMD13,PSMD14,PSMD2,PSMD3,PSMD4,PSMD6,PSMD7,PSMD8,PSME2,PSME3,PSME4
Herpes simplex infection	25	0.00158	CIRH1A,DKC1,EIF6,FBL,GAR1,GNL3,GTPBP4,NAT10,NHP2,NHP2L1,NOB1,NOL6,NOP56,NOP58,POP1,PWP2,RAN,RBM28,RCL1,TBL3,TCOF1,UTP15,WDR3,WDR36,XPO1,XRN2
Rap1 signaling pathway	25	0.0124	C1QBP,EEF1D,EIF2AK2,EIF2S1,GTF2I,HLA-A,HLA-B,HLA-C,HLA-DPB1,HLA-DRA,HLA-DRB1,HNRNPK,OAS3,PPP1CA,PPP1CB,PPP1CC,SKP1,SRPK1,SRSF1,SRSF2,SRSF3,SRSF6,SRSF7,SRSF9,USP7
			ACTB,ACTG1,CALM1,CDC42,CTNNB1,CTNND1,EPHA2,FLT1,GNAI2,GNAI3,GNAQ,GNAS,HRA S,ITGB1,MAP2K1,NRAS,PFN1,PFN2,RALA,RAP1A,RAP1B,RHOA,SRC,THBS1,TLN1

Biosynthesis of amino acids	24	2.29e-10	ACO1,ALDH7A1,ALDOA,CS,GAPDH,GOT1,GOT2,IDH1,IDH3A,MAT2A,MAT2B,PFKL,PFKP,PGA M1,PGK1,PHGDH,PKM,PRPS1L1,PRPS2,SHMT1,SHMT2,TALDO1,TKT,TP11
Tight junction	24	4.01e-05	ACTB,ACTG1,ACTN1,ACTN4,CDC42,CTNNA1,CTNNB1,EPB41L2,EXOC3,GNAI2,GNAI3,HRAS, MYH10,MYL12A,MYL12B,NRAS,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R2A,RHOA,SPTAN1,SRC,S YMPK
Pathogenic Escherichia coli infection	23	1.7e-12	ACTB,ACTG1,ARPC1B,ARPC2,ARPC3,CDC42,CTNNB1,EZR,ITGB1,NCL,RHOA,TUBA1A,TUBA 1B,TUBA4A,TUBB,TUBB2A,TUBB2B,TUBB3,TUBB4A,TUBB4B,TUBB6,YWHAQ,YWHAZ
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	23	0.000521	ATP1A1,ATP1A2,ATP1B1,ATP1B3,ATP2B1,ATP2B4,CACNA2D1,CALM1,GNAI2,GNAI3,GNAQ,G NAS,PPP1CA,PPP1CB,PPP1CC,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R2A,PPP2R5E,TPM2,TPM3, TPM4
Leukocyte transendothelial migration	22	5.48e-05	ACTB,ACTG1,ACTN1,ACTN4,CDC42,CTNNA1,CTNNB1,CTNND1,EZR,GNAI2,GNAI3,ICAM1,IT GA4,ITGB1,MMP2,MSN,MYL12A,MYL12B,RAP1A,RAP1B,RHOA,VCL
Influenza A	22	0.00843	ACTB,ACTG1,ADAR,DDX39B,DNAJB1,EIF2AK2,EIF2S1,GSK3B,HLA-DPB1,HLA-DRA,HLA- DRB1,HNRNPUL1,HSPA1A,HSPA8,ICAM1,KPNA2,MAP2K1,OAS3,RAE1,TNFRSF10B,TRIM25, XPO1
Cell cycle	21	0.000441	BUB3,CCNH,CDK6,GSK3B,HDAC1,HDAC2,MCM2,MCM3,MCM4,MCM5,MCM6,MCM7,PCNA,PR KDC,SKP1,SMC3,YWHAB,YWHAQ,YWHAZ
Platelet activation	21	0.0007	ACTB,ACTG1,ARHGEF1,GNA13,GNAI2,GNAI3,GNAQ,GNAS,ITGA2,ITGB1,MYL12A,MYL12B,P PP1CA,PPP1CB,PPP1CC,PPP1R12A,RAP1A,RAP1B,RHOA,SRC,TLN1

Tabla suplementaria 2. Proteínas presentes en los exosomas negativos para Cx43.

Rutas descritas	Número de proteínas	p-valor<0,05	Proteínas implicadas. Se indica el nombre del gen
Metabolic pathways	88	8.99e-05	ACADVL,ACAT1,ACLY,ADH5,AHCY,AK1,AK2,AKR1A1,ALDH1A3,ALDH7A1,ALDH9A1,ALDOA,ANPEP,APRT,ASS1,ATIC,ATP5B,B3GAT3,BDH2,CAD,CBR3,CMA5,CS,CTPS1,CTPS2,DLST,EPRS,FASN,G6PD,GALNT2,GANAB,GAPDH,GAPDH5,GART,GMPPB,GMPS,GNE,GOT2,GPI,GRHR,GSS,IDH3A,IMPAD1,ITPA,LAP3,LDHB,MDH1,MDH2,MPT,MR1,MTHFD1,NANS,NME1,NME2,NT5E,OAT,PAFAH1B1,PAICS,PAPSS2,PD XK,PGAM1,PGAM2,PGAM4,PGD,PGK1,PGLS,PHGDH,PKM,POLR1C,POLR2A,POLR3A,PRDX6,PRPS1L1,PRPS2,PTGES3,PYGB,QARS,QDPR,SHMT1,SHMT2,SMS,SRM,ST3GAL4,TPI1,TSTA3,UAP1,UGDH,UXS1
Ribosome	66	2.18e-50	RPL10,RPL10A,RPL11,RPL12,RPL13,RPL13A,RPL14,RPL15,RPL17,RPL18,RPL18A,RPL19,RPL21,RPL22,RPL23,RPL23A,RPL24,RPL26L1,RPL27,RPL27A,RPL28,RPL29,RPL3,RPL30,RPL31,RPL32,RPL34,RPL35,RPL35A,RPL36,RPL36A,RPL36AL,RPL4,RPL5,RPL6,RPL7,RPL7A,RPL8,RPL9,RPLP0,RPLP1,RPLP2,RPS10,RPS11,RPS13,RPS14,RPS15A,RPS16,RPS18,RPS19,RPS2,RPS20,RPS23,RPS24,RPS25,RPS26,RPS27A,RPS3,RPS3A,RPS4X,RPS5,RPS6,RPS7,RPS8,RPS9,UBA52
Spliceosome	50	1.53e-31	ACIN1,DDX23,DDX39B,DDX5,DHX15,EFTUD2,EIF4A3,HNRNPA3,HNRNPC,HNRNPK,HNRNPM,HNRNPU,HSPA1A,HSPA8,HSPB1,ICAM1,POLR1C,POLR2A,POLR3A,PSMC1,PSMC3,PSMC4,PSMC5,PSMC6,PSMD1,PSMD11,PSMD12,PSMD13,PSMD14,PSMD2,PSMD3,PSMD4,PSMD6,PSMD7,PSMD8,RAN,SND1,USP7,VIM,XPO1,YWHAB,YWHAQ,YWHAQ,YWHAQ,YWHAQ,YWHAQ,YWHAQ
Epstein-Barr virus infection	41	7.12e-15	CALM1,GNAI2,GNAI3,GNAS,GNB2,H2AFJ,H2AFV,H2AFX,H2AFY,H2AFZ,H3F3A,HDAC1,HDAC2,HIST1H2AA,HIST1H2AD,HIST1H2AH,HIST1H2AJ,HIST1H2BB,HIST1H2BD,HIST1H2BH,HIST1H2BJ,HIST1H2BK,HIST1H2BL,HIST1H2BM,HIST1H2BN,HIST1H2BO,HIST2H2AA3,HIST2H2AB,HIST2H2AC,HIST2H2BE,HIST2H2BF,HIST2H3A,HIST3H2BB,HIST3H3,H3AS,NRAS,PP1CA,PPP1CB,SLC29A1
Alcoholism	39	2.55e-18	

Viral carcinogenesis	38	2.47e-13	ACTN4,C3,CDC42,CHD4,DDB1,DDX3X,GSN,HDAC1,HDAC2,HIST1H2BB,HIST1H2BD,HIST1H2BH,HIST1H2BJ,HIST1H2BK,HIST1H2BL,HIST1H2BM,HIST1H2BN,HIST1H2BO,HIST2H2BE,HIST2H2BF,HIST3H2BB,HLAA,HLAC,HNRNPK,HRAS,NRAS,PKM,PSMC1,RAC1,RHOA,SND1,UBR4,USP7,YWHAB,YWHA E,YWHA G,YWHA Q,YWHA Z
Regulation of actin cytoskeleton	36	3.51e-10	ACTG1,ACTN4,ARPC1B,ARPC2,ARPC3,CDC42,CFL1,EZR,GSN,HRAS,IQGAP1,ITGA2,ITGA3,ITGA4,ITGA6,ITGAV,ITGB1,ITGB5,MSN,MYH10,MYH9,MYL12A,MYL12B,NCKAP1,NRAS,PFN1,PFN2,PPP1CA,PPP1CB,RAC1,RAC2,RAC3,RDX,RHOA,VCL,WASL
PI3K-Akt signaling pathway	36	5.1e-05	CDC37,COL4A2,EIF4E,EIF4E1B,EPHA2,GNB2,GSK3B,HRAS,HSP90AA1,HSP90AB1,HSP90B1,ITGA2,ITGA3,ITGA4,ITGA6,ITGAV,ITGB1,ITGB5,LAMB1,LAMC1,NRAS,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R2A,PPP2R5E,RAC1,RPS6,THBS1,THBS3,TNC,YWHAB,YWHA E,YWHA G,YWHA Q,YWHA Z
Systemic lupus erythematosus	35	1.33e-20	ACTN4,C3,H2AFJ,H2AFV,H2AFX,H2AFY,H2AFZ,H3F3A,HIST1H2AA,HIST1H2AD,HIST1H2AH,HIST1H2AJ,HIST1H2BB,HIST1H2BD,HIST1H2BH,HIST1H2BJ,HIST1H2BK,HIST1H2BL,HIST1H2BM,HIST1H2BN,HIST1H2BO,HIST2H2AA3,HIST2H2AB,HIST2H2AC,HIST2H2BE,HIST2H2BF,HIST2H3A,HIST3H2BB,HIST3H3,HLA-DRA,HLA-DRB1,SNRPB,SNRPD1,SNRPD3,SSB
Focal adhesion	32	4.09e-08	ACTG1,ACTN4,CAPN2,CDC42,COL4A2,CTNNB1,FLNA,GSK3B,HRAS,ITGA2,ITGA3,ITGA4,ITGA6,ITGAV,ITGB1,ITGB5,LAMB1,LAMC1,MYL12A,MYL12B,PPP1CA,PPP1CB,RAC1,RAC2,RAC3,RAP1B,RHOA,THBS1,THBS3,TLN1,TNC,VCL
Phagosome	30	1.17e-10	ACTG1,C3,DYNC1H1,DYNC1I2,HLA-A,HLA-C,HLA-DRA,HLA-DRB1,ITGA2,ITGAV,ITGB1,ITGB5,LAMP1,LAMP2,M6PR,RAB7A,RAC1,TFRC,THBS1,THBS3,TUBA1A,TUBA1B,TUBA3C,TUBA3E,TUBA4A,TUBB,TUBB3,TUBB4A,TUBB4B,TUBB6
RNA transport	30	4.65e-10	ACIN1,DDX39B,EEF1A1,EEF1A2,EIF2B4,EIF2S1,EIF2S2,EIF3A,EIF3B,EIF3C,EIF3CL,EIF3D,EIF3E,EIF3F,EIF3I,EIF4A3,EIF4E,EIF4E1B,EIF5B,KPNB1,NCBP1,PABPC1,PRMT5,RAE1,RAN,RNPS1,STRAP,XPO1,XPO5,XPO7
Proteoglycans in cancer	28	1.98e-05	ACTG1,ANK1,CD44,CD63,CDC42,CTNNB1,DDX5,EZR,FLNA,HRAS,IQGAP1,ITGA2,ITGAV,ITGB1,ITGB5,MMP2,MSN,NRAS,PDCD4,PLAUR,PPP1CA,PPP1CB,RAC1,RDX,RHOA,RPS6,THBS1,TIMP3
Endocytosis	27	5.96e-06	AP2A1,AP2A2,AP2B1,CDC42,CHMP4B,CLTA,CLTC,DNM2,EHD1,EHD4,FAM125A,HLA-A,HLA-C,HRAS,HSPA1A,HSPA8,LDLR,PDCD6IP,RAB11B,RAB7A,RHOA,TFRC,TSG101,VPS28,VPS37B,VPS37C,VPS4B
Pathways in cancer	26	0.0248	CDC42,COL4A2,CTNNA1,CTNNB1,GSK3B,GSTP1,HDAC1,HDAC2,HRAS,HSP90AA1,HSP90AB1,HSP90B1,ITGA2,ITGA3,ITGA6,ITGAV,ITGB1,JUP,LAMB1,LAMC1,MMP2,NRAS,RAC1,RAC2,RAC3,RHOA

Carbon metabolism	25	2.07e-10	ACAT1,ADH5,ALDOA,CS,DLST,G6PD,GAPDH,GOT2,GPI,IDH3A,MDH1,MDH2,PGAM1,PGAM2,PGAM4,PGD,PGK1,PGLS,PHGDH,PKM,PRPS1L1,PRPS2,SHMT1,SHMT2,TP11
Pathogenic Escherichia coli infection	23	1.56e-15	ACTG1,ARPC1B,ARPC2,ARPC3,CDC42,CTNNB1,EZR,ITGB1,NCL,RHOA,TUBA1A,TUBA1B,TUBA3C,TUBA3E,TUBA4A,TUBB,TUBB3,TUBB4A,TUBB4B,TUBB6,WASL,YWHAQ,YWHAZ
Protein processing in endoplasmic reticulum	23	2.86e-05	CAPN2,DNAJA1,DNAJA2,EDEM1,EIF2S1,GANAB,HSP90AA1,HSP90AB1,HSP90B1,HSPA1A,HSPA5,HSPA8,HSPH1,HYOU1,MBTPS1,PDIA3,PLAA,RAD23B,SEC23A,SEC23B,SEC31A,UBE4B,VCP
Proteasome	21	2.46e-15	PSMA5,PSMA7,PSMA8,PSMC1,PSMC3,PSMC4,PSMC5,PSMC6,PSMD1,PSMD11,PSMD12,PSMD13,PSMD14,PSMD2,PSMD3,PSMD4,PSMD6,PSMD7,PSMD8,PSME3,PSME4
Herpes simplex infection	21	0.000643	C1QBP,C3,EEF1D,EIF2S1,HLA-A,HLA-C,HLA-DRA,HLA-DRB1,HNRNPK,POLR2A,PPP1CA,PPP1CB,SRSF1,SRSF2,SRSF3,SRSF4,SRSF5,SRSF6,SRSF7,SRSF9,USP7
Rap1 signaling pathway	21	0.00443	ACTG1,CALM1,CDC42,CTNNB1,EPHA2,GNAI2,GNAI3,GNAQ,GNAS,HRAS,ITGB1,NRAS,PFN1,PFN2,RAC1,RAC2,RAC3,RAP1B,RHOA,THBS1,TLN1
Leukocyte transendothelial migration	20	4.84e-06	ACTG1,ACTN4,CDC42,CTNNA1,CTNNB1,EZR,GNAI2,GNAI3,ICAM1,ITGA4,ITGB1,MMP2,MSN,MYL12A,MYL12B,RAC1,RAC2,RAP1B,RHOA,VCL
Axon guidance	20	1.67e-05	CDC42,CFL1,DPLSL2,EPHA2,EPHB3,EPHB4,GNAI2,GNAI3,GSK3B,HRAS,ITGB1,NRAS,RAC1,RAC2,RAC3,RHOA,SEMA3A,SEMA3C,SRGAP1,SRGAP2
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	19	5.27e-13	AARS,CARS,DARS,EPRS,FARSA,FARSB,GARS,IARS,KARS,LARS,MARS,NARS,QARS,RARS,SARS,TARS,VARs,WARs,YARS
mRNA surveillance pathway	19	2.73e-07	ACIN1,CPSF1,CPSF6,DAZAP1,DDX39B,EIF4A3,NCBP1,NUDT21,PABPC1,PPP1CA,PPP1CB,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R2A,PPP2R5E,RNMT,RNPS1,WDR33
Biosynthesis of amino acids	18	5.57e-08	ALDH7A1,ALDOA,ASS1,CS,GAPDH,GOT2,IDH3A,PGAM1,PGAM2,PGAM4,PGK1,PHGDH,PKM,PRPS1L1,PRPS2,SHMT1,SHMT2,TP11
Tight junction	18	0.000285	ACTG1,ACTN4,CDC42,CTNNA1,CTNNB1,GNAI2,GNAI3,HRAS,MYH10,MYH9,MYL12A,MYL12B,NRAS,PPP2CA,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R2A,RHOA
Purine metabolism	18	0.00448	AK1,AK2,APRT,ATIC,GART,GMPs,ITPA,NME1,NME2,NT5E,PAICS,PAPSS2,PKM,POLR1C,POLR2A,POLR3A,PRPS1L1,PRPS2
Ribosome biogenesis in eukaryotes	17	6.36e-07	DKC1,EIF6,FBL,GAR1,GTPBP4,NHP2,NHP2L1,NOP56,NOP58,PWP2,RAN,RCL1,TCOF1,UTP15,WDR75,XPO1,XRN2
Gap junction	17	4.44e-06	GNAI1,GNAI2,GNAI3,GNAQ,GNAS,HRAS,NRAS,TUBA1A,TUBA1B,TUBA3C,TUBA3E,TUBA4A,TUBB,TUBB3,TUBB4A,TUBB4B,TUBB6

Tabla suplementaria 3. Proteínas exclusivas presentes en los exosomas positivos para Cx43.

Rutas descritas	Número de proteínas	p-valor<0.05	Proteínas implicadas. Se indica el nombre del gen
Metabolic pathways	56	0.000383	ACO1,ACSS2,ADK,ADSS,ADSSL1,AHCYL1,AHCYL2,ATP5A1,ATP6V1A,ATP6V1B2,ATP6V1H,B PNT1,BST1,CHSY1,CMPK1,CNDP2,DAK,DCXR,FLAD1,GALE,GBA,GFP1,GMD5,GMPPA,GOT 1,HSD17B10,IDH1,IMPDH2,INPP4B,ISYNA1,MAT2A,MAT2B,MGAT4B,PAPSS1,PDHA1,PFAS,P FKL,PFKP,PGM1,PGM2,PIK3C2A,POLR1A,POLR1B,POLR2B,POLR2E,POLR2H,POLR3B,PPAT, PTGES2,RRM1,SDHA,SPR,TALDO1,TKT,UMPS,UROD
RNA transport	17	6.35e-05	DDX20,EIF1AX,EIF3H,EIF4G1,EIF5,ELAC2,FXR1,GEMIN4,GEMIN5,NUP62,PABPC4,POP1,RBM 8A,SAP18,SEC13,SRRM1,UPF1
Purine metabolism	17	9.38e-05	ADK,ADSS,ADSSL1,IMPDH2,PAPSS1,PFAS,PGM1,PGM2,POLR1A,POLR1B,POLR2B,POLR2E, POLR2H,POLR3B,POLR3E,PPAT,RRM1
Spliceosome	15	7.99e-05	CHERP,DDX46,DHX16,DHX38,DHX8,PRPF3,PRPF38B,PRPF6,PUF60,RBM25,RBM8A,SF3A3,S F3B2,SNRNPB2,SNRPE
Endocytosis	14	0.0102	ARF6,CHMP1B,CHMP2A,DNM1,FLT1,GIT1,ITCH,NEDD4,NEDD4L,RAB5A,SRC,VPS25,VPS45,V TA1
mRNA surveillance pathway	13	6.35e-05	CPSF2,CPSF7,ETF1,GSPT1,MSI2,PABPC4,PPP1CC,RBM8A,SAP18,SRRM1,SYMPK,UPF1,WD R82
Focal adhesion	13	0.0332	ACTB,ACTN1,COL6A1,DIAPH1,DOCK1,FLT1,ITGA9,LAMA5,MAP2K1,PPP1CC,PPP1R12A,RAP 1A,SRC
Regulation of actin cytoskeleton	13	0.0392	ACTB,ACTN1,ARHGEF1,DIAPH1,DOCK1,GIT1,GNA13,GNG12,ITGA9,MAP2K1,PPP1CC,PPP1R 12A,SRC
Carbon metabolism	12	0.000527	ACO1,ACSS2,DAK,ESD,GOT1,IDH1,PDHA1,PFKL,PFKP,SDHA,TALDO1,TKT
Protein processing in endoplasmic reticulum	12	0.0188	CALR,CAPN1,DNAJB1,EIF2AK2,P4HB,PDIA6,RRBP1,SAR1A,SAR1B,SEC13,SKP1,STUB1
Pyrimidine metabolism	11	0.00142	CMPK1,POLR1A,POLR1B,POLR2B,POLR2E,POLR2H,POLR3B,POLR3E,RRM1,TXNRD1,UMPS
Phagosome	11	0.0189	ACTB,ATP6V1A,ATP6V1B2,ATP6V1H,CALR,DVNC1L1,HLA-DPB1,HLA- DRB1,RAB5A,TUBB2A,TUBB2B

RNA degradation	10	0.000527	CNOT10,DDX6,DHX36,EXOSC3,EXOSC8,EXOSC9,PABPC4,SKIV2L,SKIV2L2, TTC37
Ribosome biogenesis in eukaryotes	10	0.000602	CIRH1A,GNL3,NAT10,NOB1,NOL6,POP1,RBM28,TBL3,WDR3,WDR36
Biosynthesis of amino acids	9	0.00181	ACO1,GOT1,IDH1,MAT2A,MAT2B,PFKL,PFKP,TALDO1,TKT
RNA polymerase	7	0.000453	POLR1A,POLR1B,POLR2B,POLR2E,POLR2H,POLR3B,POLR3E
DNA replication	7	0.000803	FEN1,MCM4,MCM6,MCM7,PCNA,RFC5,SSBP1
Proteasome	7	0.00229	PSMA3,PSMA6,PSMB2,PSMB3,PSMB5,PSMB6,PSME2
Pentose phosphate pathway	6	0.00117	PFKL,PFKP,PGM1,PGM2,TALDO1,TKT
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	6	0.0188	GALE,GFP1T,GMDS,GMPPA,PGM1,PGM2
Galactose metabolism	5	0.0176	GALE,PFKL,PFKP,PGM1,PGM2
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	5	0.0288	ADSS,ADSSL1,GFP1T,GOT1,PPAT
Cysteine and methionine metabolism	5	0.0311	AHCYL1,AHCYL2,GOT1,MAT2A,MAT2B
Mismatch repair	4	0.034	MSH2,PCNA,RFC5,SSBP1

Tabla suplementaria 4. Proteínas exclusivas presentes en los exosomas negativos para Cx43.

Ruta descrita	Número de proteínas	p-valor<0.05	Proteínas implicadas
Axon guidance	6	0.0218	EPHB3,EPHB4,RAC1,RAC2,RAC3,SRGAP1